

Université Catholique de Louvain
Faculté de Médecine
de Duve Institute
Ludwig Institute for Cancer Research



**Caractérisation de la réponse T anti-vaccinale
chez des patients atteints de mélanome :**
**fréquence, diversité et état de différenciation
des lymphocytes T CD8**

Javier Carrasco

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences Biomédicales

Orientation : Immunologie des tumeurs

Promoteur Pr. Pierre van der Bruggen

2012

Promoteur :

Professeur Pierre van der Bruggen

Ludwig Institute for Cancer Research (Belgique)

Co-promoteur :

Docteur Danièle Godelaine

Ludwig Institute for Cancer Research (Belgique)

Président du jury:

Professeur Jean-Christophe Renauld,

Ludwig Institute for Cancer Research (Belgique)

Membres du jury

Professeur Pierre Coulie

Unité de Génétique Cellulaire, Université Catholique de Louvain (Belgique)

Professeur Jean-Paul Coutelier

*Unité de Médecine Expérimentale, Université Catholique de Louvain
(Belgique)*

Professeur Daniel Olive

INSERM, Institut Paoli-Calmette, Université de Marseille (France)

Docteur Jean-Luc Canon

*Service d'Oncologie et Hématologie, Grand Hôpital de Charleroi
(Belgique)*

L'apprentissage scientifique que j'ai reçu à l'Institut Ludwig m'a permis d'appréhender la complexité inouïe des maladies cancéreuses et l'exigence de la recherche dans ce domaine. Ce bagage m'accompagne quotidiennement dans ma pratique d'oncologue.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Professeur Thierry Boon pour ce précieux enseignement.

Je souhaite remercier également Aline Van Pel, Danièle Godelaine et Pierre van der Bruggen qui m'ont transmis jour après jour leur expertise scientifique. Je les remercie pour leur soutien sans faille dans cette longue aventure.

Je remercie Pierre Coulie, Etienne De Plaen, Sophie Lucas, Bernard Lethé, Francis Brasseur, Christophe Lurquin et Nicolas van Baren pour leur disponibilité, et leurs conseils.

Maria Panagiotakopoulos et Vihn Ha Thi m'ont appris les secrets du « bench » je les en remercie très sincèrement.

Je remercie le Docteur Jean-Luc Canon, le Professeur Jean-Paul Coutelier, le Professeur Daniel Olive et le Professeur Jean-Christophe Renauld, membre du Jury, pour avoir apporté leurs jugements à ce travail.

Je tiens également à remercier ici Jean-Pascal Machiels qui m'a souvent encouragé à présenter cette thèse. Son soutien, comme celui de Martine Berlière, de Danièle Godelaine et celui de mon service au sein du Grand Hôpital de Charleroi m'ont permis et me permettent encore aujourd'hui de mener de nouveaux projets de recherche dans le cadre de ma pratique clinique.

Que toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes années à l'institut trouvent ici ma reconnaissance pour leur disponibilité, leur compétence et leur générosité.

L'endurance et la tolérance de ma famille, Maïté, Nicolas, Sarah et Emilie méritent plus que des remerciements.

L'envie de comprendre est probablement la plus belle des motivations. Je remercie mes parents qui ont su me transmettre cette envie.

Enfin, je dédie cette thèse à Marc Van Damme.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien du Fond National pour la Recherche Scientifique (Télévie).

Table de matière

RESUME	5
SUMMARY	7
INTRODUCTION	9
1. Le concept d'immunosurveillance des cancers	11
1.1. <i>Observations dans des modèles murins</i>	11
1.2. <i>Existence d'une réponse T anti-tumorale spontanée chez l'homme</i>	13
2. Les antigènes tumoraux peuvent-ils avoir une utilité thérapeutique ?	18
2.1. <i>Essais de vaccination thérapeutique</i>	18
2.2. <i>Evaluation quantitative de la réponse lymphocytaire T contre un antigène</i>	21
2.3. <i>Evaluation qualitative de la réponse lymphocytaire T contre un antigène</i>	22
3. L'état fonctionnel des lymphocytes T CD8 peut-il être évalué par les marqueurs de différenciation?	24
3.1. <i>Tentative de définition des lymphocytes T effecteurs et mémoire</i>	24
3.2. <i>Marqueurs de différenciation</i>	25
3.3. <i>Modèles de différenciation des lymphocytes T CD8 et CD4</i>	30
3.4. <i>Interprétation des réponses T anti-virus et anti-tumeur sur la base des modèles de différenciation</i>	36
RESULTATS	41
1. Article 1: Réponse anti-vaccinale polyclonale après vaccination contre le mélanome avec des cellules dendritiques	43
2. Article 2: Réponse anti-vaccinale et interactions avec la réponse contre d'autres antigènes tumoraux	59
3. Article 3: Etat de différenciation des clones CTL anti-vaccinaux et signification des marqueurs CCR7 et CD45RA	87
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	117
1. Réponse lymphocytaire anti-tumorale et traitements anti-tumoraux	119
1.1. <i>Vaccination anti-tumorale</i>	119
1.2. <i>Immunomodulateurs</i>	120
1.3. <i>Chimiothérapies et thérapies ciblées</i>	121

2. Limites des marqueurs phénotypiques pour identifier des états de différenciation lymphocytaire	123
2.1. <i>Diversité importante de la population lymphocytaire T</i>	123
2.2. <i>Voies de différenciation incertaines des lymphocytes T</i>	124
2.3. <i>Confusion entre activation et différenciation</i>	126
3. CD45RA, marqueur de « repos » des lymphocytes T CD8	127
4. Réinterprétation de la littérature concernant la différenciation des lymphocytes T CD8	130
4.1. <i>Pathologies virales</i>	130
4.2. <i>Pathologies tumorales</i>	132
5. Analyse de l'infiltration lymphocytaire dans des tumeurs mammaires primitives	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
ANNEXE	175
1. Article 4 : Identification d'un nouvel antigène codé par <i>MAGE-C2</i> et présenté à des lymphocytes T cytolytiques par les molécules HLA-B44	177

Abréviations :

ALVAC	de l'anglais : ALbany VACcine
APC	de l'anglais : Antigen Presenting Cell
CCR7	de l'anglais : Cc-Chemokine Receptor 7
CDR3	de l'anglais : Complementarity determining region 3
CTLA-4	de l'anglais : cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CTL(p)	de l'anglais : Cytolytic T Lymphocyte (precursor)
CD4 Treg	Lymphocyte T CD4 régulateur
CMV	CytoMegaloVirus
DC	de l'anglais : Dendritic Cell
EBV	Epstein-Barr Virus
FDA	de l'anglais : Food and Drug Administration
FOXP3	de l'anglais : Forkhead boX P3
HCV	de l'anglais : Hepatitis C Virus
HEV	de l'anglais : High Endothelial Venules
IFN	InterFeroN
IHC	ImmunoHistoChimie
HIV	de l'anglais : Human Immunodeficiency Virus
HLA	de l'anglais : Human Leukocyte Antigen
hTERT	de l'anglais : human TElomerase Reverse Transcriptase
HS	de l'anglais : Human Serum
ICAM-1	de l'anglais : InterCellular Adhesion Molecule-1
LFA-1	de l'anglais : Lymphocyte Function-Associated Ag
NK	de l'anglais : Natural Killer cell
NSCLC	de l'anglais : Non Small Cell Lung Cancer
MAGE	de l'anglais : Melanoma Antigen GEne

MLPC	de l'anglais : Mixed Lymphocyte Peptide Culture
PD-1	de l'anglais : Programmed Death-1
PAP	de l'anglais : Prostatic Acid Phosphatase
RAG2	de l'anglais : Recombination-Activating Gene-2
RECIST	de l'anglais : Response Evaluation Criteria In Solid Tumor
STAT1	de l'anglais : Signal Transducer and Activator of Transcription 1
TCR	de l'anglais : T Cell Receptor
TIL	de l'anglais : Tumor Infiltrating Lymphocytes
TLR	de l'anglais : Toll-Like Receptor
TNF	de l'anglais : Tumor Necrosis Factor
TNM	de l'anglais : Tumor Node Metastasis
TRP-1 ou 2	de l'anglais : Tyrosinase-Related Protein 1 or 2

Résumé

De nombreux vaccins thérapeutiques ont été évalués chez des patients atteints de mélanome métastatique. Des régressions tumorales ont été observées chez 20% des malades vaccinés, avec, exceptionnellement, des réponses cliniques complètes et prolongées. Certains chercheurs ont utilisé des cellules dendritiques autologues chargées avec des antigènes tumoraux pour vacciner des patients car ces cellules sont supposées être très efficaces pour présenter des antigènes aux lymphocytes T.

Un premier objectif de notre travail fut d'évaluer les réponses CTL anti-vaccinales chez plusieurs patients vaccinés avec des cellules dendritiques chargées avec des antigènes dérivés de la protéine MAGE-3. Le vaccin s'est avéré capable d'induire une réponse chez quatre des cinq patients analysés. Cette réponse était polyclonale chez trois des quatre patients répondeurs. Les fréquences de CTL anti-vaccinaux que nous avons observées dans le sang variaient de 1/1.000 à 1/100.000 parmi les lymphocytes T CD8. Même si ces réponses étaient généralement faibles, elles étaient corrélées aux régressions tumorales observées. Chez une des patientes nous avons étendu notre analyse au-delà de la réponse anti-vaccinale et analysé la réponse T dirigée contre différents antigènes exprimés par la tumeur. Nous avons ainsi identifié un clone CTL dirigé contre un de ces antigènes, inconnu jusque là et dérivé de la protéine MAGE-C2. La fréquence de ce CTL dans le sang augmentait parallèlement à la vaccination. A la différence des CTL anti-vaccinaux, ce clonotype se concentrait fortement dans des métastases cutanées. Il est tentant de penser qu'il a joué un rôle important dans la régression de certaines de ces métastases.

Nous nous sommes également intéressés au profil fonctionnel des CTL anti-vaccinaux que nous avons isolés du sang des patients. Etant donné que de nombreuses publications associent un profil fonctionnel à un état de différenciation des lymphocytes T, nous avons analysé le phénotype des clones anti-vaccinaux en utilisant différents marqueurs de différenciation décrits dans la littérature, tels que CCR7 et CD45RA. Tous les clones analysés avaient perdu l'expression de CCR7 et certains exprimaient fortement CD45RA. En contradiction avec les modèles de différenciation publiés, ces clones CCR7⁻/CD45RA⁺ ne semblaient pas avoir atteint un état de différenciation terminale, gardant entre autre des capacités de prolifération importantes. Nos observations montrant des variations cycliques de l'expression de CD45RA en fonction des contacts antigéniques, cela nous a conduits à proposer la réexpression de CD45RA à la surface des lymphocytes T CD8 CCR7⁻ non pas comme un signe de différenciation terminale, mais comme le reflet d'une absence prolongée de contact antigénique.

Summary

A number of therapeutic vaccines have been evaluated in patients with metastatic melanoma. Tumor regressions were observed in 20% of the vaccinated patients. Complete and long-term clinical responses have been occasionally observed. Some researchers have used autologous dendritic cells loaded with antigenic peptides to immunize patients, because dendritic cells are considered very effective in antigen presentation to T cells.

A first objective of our work was to evaluate the anti-vaccine CTL responses in several patients vaccinated with dendritic cells loaded with antigens derived from the protein MAGE-3. The vaccine was able to induce a response in four of the five analyzed patients. This response was polyclonal in three of the four responding patients. The frequencies of anti-vaccine CTL ranged from 1/1 000 to 1/100 000 of blood CD8 T cells. While these responses were generally low, they seemed to be associated with tumor regressions. In one patient, we were able to extend our analysis beyond the anti-vaccine CTL response and we analyzed the T cell response directed against various antigens expressed by the tumor. We identified a CTL clone directed against one of these antigens. This antigen was previously unknown and derived from protein MAGE-C2. The frequency of anti-MAGE-C2 CTL in the blood increased after vaccination. Unlike the anti-vaccine CTL, this CTL clonotype was found to accumulate in cutaneous metastases. It is tempting to think that it played an important role in the regression of some of these metastases.

We also decided to examine the functional profiles of the anti-vaccine CTL that were isolated from the blood of patients. Since many publications associate the

expression of several surface markers with a functional differentiation status of T cells, we analyzed the phenotype of the anti-vaccine CTL clones using differentiation markers described in the literature, namely CCR7 and CD45RA. All the analysed clones had lost the expression of CCR7, and some of them strongly expressed CD45RA. In contradiction with published differentiation models, those CCR7⁻/CD45RA⁺ clones did not seem to have reached a terminally differentiated status, as they kept important proliferative capacities. Our observations revealing cyclic variations of CD45RA expression depending on the antigenic contacts, we propose that CD45RA re-expression on CCR7⁻ CD8 T cells is a consequence of a prolonged lack of antigenic contact rather than the sign of a terminal differentiation.

Introduction

L'influence du système immunitaire sur le développement des tumeurs cancéreuses a longtemps été une notion controversée. La mise en évidence des antigènes tumoraux a consolidé cette notion en confirmant que les tumeurs sont antigéniques. Cette découverte a ouvert la voie à l'immunothérapie par vaccination anti-cancéreuse. Pour valider cette approche thérapeutique, il fallait démontrer l'immunogénicité de ces antigènes. Telle était la tâche à laquelle étaient atelées les équipes de Pierre Coulie et Aline Van Pel lorsque j'ai rejoint le laboratoire.

1. Le concept d'immunosurveillance des cancers

1.1. Observations dans des modèles murins

L'éventuelle capacité du système immunitaire à détecter et éliminer les cellules présentant une dégénérescence cancéreuse est le fondement du concept de l'immunosurveillance des cancers tel que proposé par Burnet ^(1,2). Au cours des années 1970, les études menées sur des souris immunodéficientes ne montrèrent pas d'incidence accrue de cancers chemo-induits ⁽³⁾, plaidant ainsi contre l'hypothèse d'une immunosurveillance du cancer. L'hypothèse fut donc délaissée. 30 ans plus tard, Shankaran et son équipe réalisèrent des travaux sur des souris présentant une délétion du gène « *Recombination-Activating Gene-2* » (RAG2) et en conséquence une absence totale de lymphocytes et de cellules « Natural Killer » (NK). Les auteurs observèrent que la fréquence de cancers induits par l'injection sous-cutanée du carcinogène chimique méthylcholanthrène était significativement plus importante chez les souris lymphopéniques que chez les souris sauvages ⁽⁴⁾. Quelques années avant, d'autres chercheurs avaient mené des expériences de tumorigénèse avec du méthylcholanthrène sur des souris 129/sv ayant perdu le gène « *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* » (STAT1) qui code pour un facteur de transcription intervenant dans la transduction cellulaire de la réponse aux interférons. Ils avaient également constaté une incidence accrue de sarcomes chemo-induits chez ces souris par rapport aux souris sauvages ⁽⁵⁾. D'autres expériences utilisant des modèles de tumorigénèse chemo-induite chez la souris, avaient révélé que l'administration conjointe d'IL-12 limitait l'apparition de sarcomes induits ⁽⁶⁾. Or la cytokine IL-12 régule la production d'IFN γ tant dans la réponse immune innée qu' adaptative. Ces différentes observations ont relancé l'intérêt pour la notion d'immunosurveillance anti-cancéreuse, en soulignant que chez la souris,

cette immunosurveillance semble dépendre de la fonction lymphocytaire et plus précisément de la production d'IFN γ .

En 1983, Maryanski et Boon analysèrent le rejet de variants immunogéniques du mastocytome P815 obtenus par mutagénèse et greffés chez des souris. Ils constatèrent alors que dans certains cas ce rejet n'avait pas lieu, et que cela était lié à la perte de déterminants antigéniques par les cellules tumorales greffées ⁽⁷⁾. Ces observations témoignaient déjà d'un concept qui sera dénommé 20 ans plus tard « immunoediting » en anglais ⁽⁸⁾, suite à des observations similaires dans des modèle murins. Shankaran et Schreiber ont montré que les tumeurs chemo-induites chez des souris immunodéficientes *RAG2*^{-/-} étaient rejetées après transplantation dans des souris immunocompétentes, mais par contre, les tumeurs induites chez des souris immunocompétentes étaient rarement rejetées ⁽⁴⁾. Les auteurs ont conclu que le système immunitaire sélectionnait des cellules tumorales immunorésistantes. Le concept de l'« immunoediting » englobe la notion d'immunosurveillance dans un modèle plus large où le système immunitaire aurait une influence ambivalente sur le cancer. Cette influence pourrait aboutir à l'élimination de tumeurs naissantes, mais pourrait également sélectionner les cellules cancéreuses capables d'échapper à la détection par des cellules immunes. La sélection des clones tumoraux résistants, surpassant d'éventuels freins à leur prolifération, est une constante en oncologie à laquelle se heurtent toutes les stratégies thérapeutiques. « L'immunoediting » est une adaptation de cette évidence à une pression de sélection du système immunitaire sur le cancer.

Néanmoins, ces concepts restent controversés. Des travaux récents menés sur un modèle murin de tumeurs sporadiques, modèle qui se veut plus proche des tumeurs humaines que ceux utilisant des carcinogènes, remettent en question l'existence d'une immunosurveillance anti-tumorale efficace. Les auteurs ont mis au point une

construction génétique contenant un oncogène dormant (SV40) utilisé dans des souris transgéniques. L'oncogène dormant peut être activé suite à de rares événements stochastiques induisant l'apparition d'une tumeur exprimant un antigène tumoral connu. Chez ces souris, l'apparition d'une tumeur induit un phénomène de tolérance immune avec apparition d'une réponse lymphocytaire T non-fonctionnelle contre l'antigène tumoral présenté par les cellules cancéreuses ⁽⁹⁾. Les auteurs ont conclu à l'existence d'une immunotolérance face au cancer à la place de l'immunosurveillance avancée par d'autres.

1.2. Existence d'une réponse T anti-tumorale spontanée chez l'homme

Chez l'homme, il existe des arguments en faveur de l'existence d'une immunosurveillance contre les tumeurs. Des publications portant sur une cohorte de plus de 400.000 personnes présentant une immunosuppression consécutive à l'infection par le virus HIV, ou de plus de 30.000 personnes recevant un traitement immunosuppresseur après une greffe d'organe, montrent que le risque de développer certains cancers chez ces individus est nettement supérieur à celui de la population normale ⁽¹⁰⁾. Ainsi, par rapport à la population normale, les individus infectés par le virus HIV ont 70x plus de risque de développer des lymphomes non-hodgkiniens, et 3x plus de risque de développer un cancer pulmonaire ou cérébral. Toujours par rapport à une population normale, les individus transplantés ont 28x plus de risque de développer des cancers cutanés autres que les mélanomes, 2x plus de risque de développer des mélanomes, 6x plus de risque de développer des tumeur rénales ou 6x plus de risque de développer des tumeurs thyroïdiennes. Certains types de cancers comme les tumeurs mammaires ou prostatiques, ne semblent pas avoir une incidence accrue dans la population immunodéprimée. Les observations menées dans ces deux populations suggèrent que l'état d'immunodépression est responsable de l'accroissement du risque

de cancer plutôt que d'éventuels facteurs de risque différents d'un groupe à l'autre de patients. Il est important de souligner que certains de ces cancers plus fréquents chez ces individus immunodéprimés peuvent être liés à des causes infectieuses tandis que d'autres comme le mélanome, le cancer pulmonaire ou le cancer thyroïdien ne sont à priori pas liés à des causes infectieuses.

L'existence d'un mécanisme d'immunosurveillance chez l'homme est également appuyée par les observations montrant une association entre l'infiltration de la tumeur primitive par des lymphocytes T et un pronostic plus favorable. Une étude rétrospective menée sur 186 patientes atteintes de cancer ovarien avancé montre une survie à 5 ans de 38% chez les patientes présentant une tumeur infiltrée par des lymphocytes T tandis que la survie des patientes dont la tumeur est exempte d'infiltrat lymphocytaire chute à 4,5%⁽¹¹⁾. L'influence favorable de l'infiltrat lymphocytaire a été observée dans de nombreux cancers au stade localisé : les mélanomes⁽¹²⁾, les carcinomes de l'œsophage⁽¹³⁾, les carcinomes prostatiques⁽¹⁴⁾ et les carcinomes mammaires⁽¹⁵⁾ parmi d'autres cancers. Dans les cancers coliques, l'infiltrat lymphocytaire peut rester en marge de la tumeur ou pénétrer à l'intérieur de celle-ci. La prise en compte de cette distribution topographique lors de l'évaluation de l'infiltrat lymphocytaire a permis d'améliorer l'estimation du pronostic. Ce nouveau facteur pronostique évalue mieux le risque de récurrence que les critères histopathologiques classiquement utilisés sur base de la stadification TNM^(16,17).

Même si ces analyses corrélatives supportent l'hypothèse de l'existence d'une réponse immune anti-tumorale adaptative influençant l'évolution de la tumeur, elles n'en apportent pas de preuves mécanistiques. Certaines observations ponctuelles semblent confirmer cette hypothèse en précisant les effecteurs responsables de cette réponse anti-tumorale spontanée. Ainsi, l'équipe de Rosenberg a isolé des lymphocytes

infiltrant les tumeurs (TIL) à partir de mélanomes primitifs ou de métastases ganglionnaires. Après isolement et amplification *in vitro*, ces TIL sont capables de lyser des cellules tumorales autologues mises en suspension *ex vivo* (non cultivées). Des expériences thérapeutiques par transfert adoptif de ces TIL préalablement amplifiés *in vitro* ont montré certaines régressions tumorales chez des patients atteints de mélanome métastatique au prix malheureusement d'importants effets secondaires par réactions auto-immunes ^(18,19,20). Dans des prélèvements de moelle osseuse provenant de patients présentant une gammapathie monoclonale, pathologie précancéreuse qui se caractérise par la production d'immunoglobulines par un clone lymphocytaire B, des lymphocytes T autologues dirigés contre ce clone B ont été identifiés. En effet, ceux-ci produisaient de l'IFN γ après co-culture avec des cellules dendritiques autologues chargées avec des lysats de lymphocytes B précancéreux ⁽²¹⁾. Cette réponse lymphocytaire T n'était plus retrouvée chez des patients atteints de myélome multiple, stade cancéreux de la même pathologie, suggérant que la réponse anti-tumorale pourrait avoir un rôle dans des états précancéreux.

La mise en évidence d'antigènes tumoraux présents à la surface de tumeurs humaines apporte un argument en faveur du concept d'immunosurveillance en précisant les cibles immunitaires contre lesquelles la réaction immune anti-tumorale est dirigée. Depuis la découverte d'un antigène spécifique de tumeur reconnu sur une lignée de mélanome par des lymphocytes T cytolytiques (CTL) autologues ⁽²²⁾, l'existence de nombreux antigènes tumoraux dans plusieurs types de tumeurs a été prouvée. Ces antigènes peuvent être classés en quatre catégories, détaillées ci-dessous.

Des travaux sur le mélanome ont mis en évidence des familles de gènes exprimés uniquement dans des cellules germinales et dans certains mélanomes ou autres tumeurs. Tenant compte que les cellules germinales n'expriment pas de molécules

d'histocompatibilité (HLA), elles sont donc incapables de présenter des antigènes à leur surface. Par conséquent, les antigènes codés par ces gènes dénommés en anglais « cancer-germline » sont spécifiques des cellules tumorales ^(23,24). Un exemple représentatif de ce type de gènes est la famille des gènes *MAGE* comportant 24 gènes regroupés en 3 sous-familles dénommées A, B et C, toutes localisées sur le chromosome X ^(25,24). L'expression de ces gènes dans des tumeurs semble être liée à des phénomènes de déméthylation inhérents à la tumorigénèse ⁽²⁶⁾. Des antigènes codés par la famille des gènes *MAGE* ont été et sont utilisés dans de nombreux protocoles expérimentaux de vaccination anti-tumorale.

Les cellules tumorales portent de nombreuses mutations ou réarrangements génétiques somatiques. Entre 20.000 et 30.000 mutations ont été identifiées dans des lignées tumorales grâce aux techniques de séquençage à haut débit, et on estime que parmi les 1% se trouvant dans des régions codantes, seulement 1% aboutit à l'expression d'une protéine mutée ⁽²⁷⁾. Ces protéines peuvent engendrer des antigènes ayant des caractéristiques très intéressantes d'un point de vue immunologique : ces antigènes ne peuvent pas avoir induit de tolérance immunologique car ils ne font pas partie du « soi » et ils sont strictement spécifiques des cellules tumorales pour un individu donné. Des réponses spontanées contre des antigènes mutés ont été décrites. Chez un patient atteint d'un mélanome métastatique avec une évolution atypique sur plus de 10 ans, Baurain et Coulie ont mis en évidence une réponse CD8 dirigée contre un antigène dérivé d'une protéine mutée exprimée spécifiquement par les cellules tumorales ⁽²⁸⁾. Plus de 1% des CD8 sanguins du patient étaient dirigés contre cet antigène, ce qui est une fréquence particulièrement élevée pour une réponse dirigée contre un antigène tumoral spécifique. Des résultats similaires ont été décrits chez un patient atteint d'un carcinome épidermoïde d'origine pulmonaire en rechute. Le patient

avait développé une importante réponse CD8 dirigée contre un antigène issu d'une mutation somatique tumorale ⁽²⁹⁾. Il semble que les réponses lymphocytaires contre des antigènes tumoraux mutés ne soient pas un phénomène exceptionnel, comme le suggèrent les observations de Lennerz et Wölfel en 2005, décrivant chez un patient 8 nouveaux antigènes tumoraux dont 5 engendrés par des mutations somatiques tumorales ⁽³⁰⁾.

La surexpression de certaines protéines caractérise de nombreux cancers. 10% des cancers coliques et 30% des cancers pulmonaires surexpriment le récepteur « Epithelial Grow Factor Receptor » (EGFR). Une amplification du gène codant pour le récepteur CerbB2 ou Her2-Neu est observée dans 20% des carcinomes mammaires, entraînant une surexpression du récepteur. Des réponses lymphocytaires anti-tumorales, dirigées contre des antigènes dérivés de ces protéines surexprimées, ont été décrites. Ainsi, une réponse lymphocytaire CD8 spontanée contre un antigène provenant de la protéine télomérase (hTERT), surexprimée dans plus de 90% des cancers, a été observée chez certains patients présentant des tumeurs prostatiques, mammaires, pulmonaires et gastriques ⁽³¹⁾. Une réponse lymphocytaire CD4 dirigée contre des antigènes dérivés de la télomérase a également été détectée chez des patients atteints de tumeurs pulmonaires ⁽³²⁾. De plus une réponse contre cette protéine est détectée chez 80% des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) en rémission après traitement par Imatinib ⁽³³⁾. Une réponse spontanée contre un antigène provenant de la protéine CerbB2 a également été décrite chez des patients atteints de cancer mammaire, ovarien, pulmonaire, prostatique ou colique ⁽³⁴⁾. L'utilisation de ces antigènes dans un but thérapeutique se heurte à leur expression ubiquitaire, impliquant une possible tolérance, ou dans le cas où celle-ci serait levée, à un risque de réaction auto-immune.

Chez les patients atteints de mélanome, des réponses lymphocytaires dirigées contre des antigènes dérivés de protéines de différenciation mélanocytaire comme tyrosinase, Melan-A/MART-1, gp100/pMel17 ou tyrosinase-related protein 1 et 2 (TRP-1 et TRP-2) ont été détectées ^(35,36,37). Il ne semble pas y avoir de tolérance induite par ces antigènes car des réactions auto-immunes ont été observées suite à des essais d'immunothérapie contre Melan-A/MART-1 ^(38,39).

2. Les antigènes tumoraux peuvent-ils avoir une utilité thérapeutique ?

2.1. Essais de vaccination thérapeutique

L'immunité anti-tumorale spécifique a initialement été décrite dans des modèles murins ⁽⁴⁰⁾. Il existe un nombre important de travaux démontrant que chez la souris une immunisation contre des variants immunogéniques obtenus à partir de différentes lignées tumorales induit la régression et le rejet de greffes tumorales ^(41,42,4). Néanmoins ces résultats ont été obtenus en utilisant des lignées tumorales modifiées par mutagenèse ou des tumeurs induites par des carcinogènes et il est probable que celles-ci présentent un caractère plus immunogène que les tumeurs spontanées humaines ⁽⁴³⁾.

Chez l'homme, la majorité des essais cliniques avec des vaccins anti-tumoraux ont été menés chez des patients présentant des tumeurs multi-métastatiques échappant à tout traitement conventionnel. Dans ces conditions, les taux de réponses aux vaccins restent très faibles. Des essais de phase II utilisant des lysats cellulaires de mélanome ou les protéines issues du surnageant de cultures de mélanomes ont été menés chez des patients atteints de mélanome métastatique. Le taux de réponses observé ne dépasse pas 20% avec un des vaccins utilisés, « Melacine » ⁽⁴⁴⁾. Ce même vaccin a été testé en tant que traitement adjuvant, après exérèse du mélanome primitif. Aucun bénéfice en terme de survie sans rechute ou survie globale n'a été observé ^(45,46).

Un vaccin contre la protéine « Prostatic Acid Phosphatase » (PAP) a été mis au point pour traiter les patients atteints de cancer prostatique. La technique de vaccination utilise des cellules dendritiques autologues chargées avec une protéine recombinante contenant le facteur de croissance GM-CSF et la protéine PAP. Trois essais cliniques randomisés de phase III ont été réalisés avec le vaccin, dont le dernier incluant un total de 512 patients a montré un bénéfice significatif en terme de survie chez les patients vaccinés ⁽⁴⁷⁾. Le vaccin a été administré à des patients ayant une tumeur prostatique métastatique résistante à un traitement hormonal. Trois ans après la vaccination, 32% des patients vaccinés étaient toujours en vie contre 22% des patients du groupe contrôle. Ces résultats ont permis en avril 2010 l'enregistrement, auprès de la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis, du vaccin (Sipuleucel-T ou Provenge®) dans l'indication du cancer prostatique métastatique hormonorésistant.

Les antigènes codés par les gènes « cancer-germline » sont de bons candidats pour les tentatives de vaccination anti-tumorale car ils ne sont présents que sur les cellules tumorales. De nombreux essais exploratoires utilisant ces antigènes ont été réalisés chez des patients atteints de mélanome. De nombreuses techniques de vaccination ont été évaluées : (a) un peptide antigénique synthétique provenant de la protéine MAGE-3 injecté en sous-cutané ⁽⁴⁸⁾, (b) des cellules dendritiques dérivées de monocytes sanguins autologues prélevés chez des patients atteints de mélanome métastatique, chargées avec le peptide dérivé de MAGE-3 et réinjectées chez les mêmes patients ⁽⁴⁹⁾, (c) des virus modifiés contenant dans leur génome une portion du gène *MAGE-3* (ALVAC) ⁽⁵⁰⁾. Après vaccination selon ces différents protocoles, une régression d'au moins une lésion tumorale est observée chez $\pm 20\%$ des patients. L'efficacité clinique de ces différents protocoles de vaccination reste cependant limitée, avec une réponse clinique objective sur base des critères de la World Health

Organisation (WHO) ⁽⁵¹⁾ qui ne dépasse pas 6%. Néanmoins, chez certains patients des réponses complètes durables ont été décrites. Les études récentes testant l'utilité de traitements anti-cancéreux par immunothérapie semblent indiquer que la cinétique des réponses cliniques observées avec ces approches thérapeutiques est particulière : des réponses peuvent apparaître tardivement, voire même après une phase initiale où la tumeur semble progressive. Les critères d'évaluation de la réponse tumorale utilisés actuellement (critères RECIST) semblent inadaptés à l'évaluation des traitements anti-cancéreux par immunothérapie ⁽⁵²⁾.

Un vaccin avec une protéine recombinante comprenant la protéine MAGE-3 associée avec un adjuvant immunologique est actuellement en cours d'évaluation chez des patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC) localisé de stade IB, II ou III, et pouvant bénéficier d'une résection complète de la tumeur primitive. 2.270 patients présentant une tumeur qui exprime le gène *MAGE-3* ont été inclus dans l'étude de phase III et ont reçu soit le vaccin, soit un placebo, selon une procédure de randomisation en double aveugle. Le vaccin est administré en tant que traitement adjuvant après l'exérèse de la tumeur. Si une chimiothérapie adjuvante est requise sur base de la stadification initiale, le vaccin est administré après la fin de la chimiothérapie. Le but principal de l'étude est de déterminer si la vaccination avec la protéine MAGE-3 en tant que traitement adjuvant permet de diminuer le taux de rechute. Les inclusions dans cet essai clinique ont été clôturées fin 2011. Une autre étude similaire teste le même vaccin en tant que traitement adjuvant chez des patients atteints de mélanome, après résection complète de la tumeur primitive. L'étude de phase III doit inclure 1.300 patients présentant un mélanome avec extension ganglionnaire et exprimant le gène *MAGE-3*. Elle a pour but de déterminer si une vaccination chez ces patients améliore la survie sans récurrence.

Au cours d'études exploratoires menées sur de petites séries de patients, des analyses immunologiques très détaillées ont permis d'évaluer l'immunogénicité des vaccins utilisant des antigènes tumoraux spécifiques. Ces études sont indispensables pour valider le concept de l'immunothérapie anti-tumorale. Mais le nombre de patients inclus dans chacun de ces protocoles est tellement restreint qu'aucune conclusion statistiquement significative concernant le bénéfice clinique ne peut être tirée pour l'instant. Les études en cours sur de larges cohortes apporteront sans doute des informations importantes sur l'éventuelle efficacité clinique de l'immunothérapie avec des antigènes tumoraux spécifiques.

2.2. Evaluation quantitative de la réponse lymphocytaire T contre un antigène

L'importance de la réponse immune induite contre l'antigène vaccinal est une information importante qui détermine l'immunogénicité d'un vaccin anti-cancéreux. Des stratégies diverses ont été mises en œuvre pour mesurer cette réponse. Certaines détectent les effecteurs dirigés contre l'antigène vaccinal sur base de leurs capacités fonctionnelles après stimulation antigénique. La technique ELISPOT évalue le nombre de cellules individuelles sécrétant de l'IFN γ ou du TNF α via un marquage de la cytokine préalablement retenue en périphérie de la cellule par des anticorps de capture. Les cellules marquées apparaissent comme des « spots » qui peuvent être comptabilisés par analyse d'image informatisée ⁽⁵³⁾. Il est également possible de procéder à un marquage intracellulaire après stimulation antigénique associée à l'ajout de BrefeldineA, substance inhibant le relargage de la cytokine qui, bloquée à l'intérieur de la cellule, peut être marquée par des anticorps fluorescents après perméabilisation des membranes cellulaires. Ces deux techniques permettent de détecter des fréquences de l'ordre de 1 effecteur parmi 2.000 CD8. Ces deux approches entraînent la destruction des cellules marquées avec impossibilité de clonage *in vitro*.

En 1996, des complexes dénommés « tétramères », comprenant plusieurs molécules HLA recombinantes biotinylées, chargées avec un peptide antigénique et multimérisées autour d'une streptavidine fluorescente, ont été mis au point ⁽⁵⁴⁾. Ces tétramères peuvent se lier aux récepteurs T lymphocytaires (TCR) spécifiques de leur antigène et ils permettent ainsi de détecter des lymphocytes T par cytométrie en flux, sur base de leur spécificité antigénique. La technique de marquage par tétramères permet la détection de lymphocytes T à une fréquence de $\pm 3 \times 10^{-4}$ parmi les CD8, et à la différence des deux approches préalables, elle permet le tri et l'amplification *in vitro* des cellules marquées. Il est ainsi possible de confirmer la spécificité antigénique et d'analyser la diversité du répertoire des lymphocytes dirigés contre un antigène précis ⁽⁵⁵⁾.

Une autre technique tire parti de la variabilité des récepteurs TCR dont la séquence génétique caractérise chaque clone lymphocytaire T. Cette approche, dénommée PCR clonotypique, permet de détecter la présence d'un clone dans un prélèvement par la séquence génétique codant pour les régions hypervariables (CDR3) des chaînes α ou β du TCR grâce à une amplification de cette séquence par des PCR spécifiques ^(56,57). Cette dernière approche possède plusieurs atouts : elle n'est dépendante d'aucun biais de sélection fonctionnelle, et elle permet l'évaluation des prélèvements avec des cellules en suspension comme les échantillons sanguins, ainsi que des prélèvements tissulaires même fixés ou congelés. Néanmoins, la PCR clonotypique ne peut être mise au point que sur des clones pour lesquels la séquence du TCR est connue.

2.3. Evaluation qualitative de la réponse lymphocytaire T contre un antigène

De nombreuses observations dans des modèles murins et dans des tumeurs humaines suggèrent un rôle important de l'IFN γ dans la réaction immune anti-tumorale ^(5,58).

L'IFN γ provoque une augmentation de l'expression des molécules HLA de classe I entraînant en principe une immunogénicité accrue des cellules tumorales. Il peut déclencher la production de nombreuses cytokines provoquant le recrutement de lymphocytes T. Plusieurs études utilisant les techniques d'analyse d'expression génétique ou analysant les profils de déméthylation de l'ADN sur différents types de tumeurs, ont mis en évidence une série de gènes dont l'expression était corrélée à un meilleur pronostic. Parmi ces gènes se trouvent ceux codant pour les protéines effectrices des lymphocytes T CD8, les cytokines comme l'IFN γ et l'IL-12, ou des facteurs de transcription comme t-BET signant un profil fonctionnel de type Th1 ^(59,60).

Il a été proposé que certains CD4, dénommés T CD4 régulateurs ou CD4 Treg, ont un rôle inhibiteur sur la réponse immunitaire. Cette fonction immunosuppressive des CD4 Treg est suspectée comme une des explications de l'échappement des tumeurs face au mécanisme d'immunosurveillance. Un marqueur fréquemment proposé pour identifier ces CD4 Treg est le facteur de transcription Forkhead box P3 (FOXP3) ainsi que l'expression de CD25. Ainsi, une étude semble indiquer que des tumeurs ovariennes qui sont infiltrées par des lymphocytes CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ ont un pronostic plus défavorable ⁽⁶¹⁾. Ces résultats restent néanmoins controversés car des études sur d'autres tumeurs ne retrouvent pas cette influence défavorable des Treg sur le pronostic des patients ⁽⁶²⁾, voire même pour certaines de ces études, une influence favorable semble prévaloir ^(63,64). De plus, la caractérisation des CD4 Treg est difficile car le marqueur FOXP3 peut être exprimé transitoirement par des lymphocytes T CD4 activés ⁽⁶⁵⁾. A l'heure actuelle, le seul élément permettant d'identifier les Treg chez l'homme, semble être la déméthylation d'ilots CpG localisés dans une région bien définie du gène *FOXP3* ⁽⁶⁶⁾.

Dans le domaine des pathologies infectieuses, des réponses lymphocytaires peuvent réussir à contrôler et à éradiquer certains pathogènes. Ces réponses peuvent servir de référence en tant que contrôle immunitaire efficace. Des travaux ont tenté de caractériser ces réponses, particulièrement les réponses anti-virales, en associant certains profils fonctionnels des lymphocytes T avec un processus de différenciation ^(67,68). Par analogie, cette démarche a également été appliquée à des réponses anti-tumorales. Néanmoins, à la différence des pathologies infectieuses, il n'existe pas de référence claire permettant de définir une réponse lymphocytaire anti-tumorale efficace.

3. L'état fonctionnel des lymphocytes T CD8 peut-il être évalué par les marqueurs de différenciation?

3.1. Tentative de définition des lymphocytes T effecteurs et mémoire

Après un premier contact antigénique, le lymphocyte T activé prolifère de manière importante, entraînant une amplification clonale. La majorité des cellules issues de cette amplification va acquérir des fonctions effectrices puis disparaître par la suite lors d'une phase de contraction de la réponse immune. Une minorité va persister, assurant le rôle de mémoire immunologique. La définition de lymphocyte « naïf » comme étant un lymphocyte n'ayant jamais eu de contact antigénique est simple et admise par tous. Par contre, la définition de lymphocyte « effecteur » ou « mémoire » est plus complexe. Les effecteurs T ont été définis, par opposition aux cellules naïves, comme étant les cellules sur lesquelles repose l'efficacité d'une réponse lymphocytaire T. Mais les fonctionnalités nécessaires à cette efficacité sont difficiles à définir car elles sont multiples et variables d'une pathologie à l'autre. La définition des lymphocytes T mémoire est encore plus complexe. Certains auteurs ont proposé deux critères minimaux qui les distinguent des effecteurs : (1) c'est une population lymphocytaire qui persiste après disparition de l'antigène contre lequel elle est dirigée et

(2) les lymphocytes T mémoire sont capables de proliférer à nouveau après un nouveau contact antigénique. Ces deux critères comportent néanmoins des limites. En effet, il n'y a pas de consensus sur le délai minimum après clairance de l'antigène avant lequel les lymphocytes sont qualifiés d'effecteurs au repos et au-delà duquel ils sont qualifiés de cellules T mémoire. De plus, cette définition est inadaptée à des situations où il n'y a pas de clairance de l'antigène ou lorsque celle-ci est lente comme dans des infections virales chroniques, des maladies auto-immunes ou cancéreuses.

Les modèles de différenciation ont pour but de préciser ces définitions en tentant de distinguer des sous-populations de lymphocytes T correspondant à l'état naïf, l'état effecteur et l'état mémoire. Plusieurs auteurs ont proposé d'associer ces états de différenciation lymphocytaire à des profils fonctionnels caractéristiques et d'identifier les populations grâce à l'expression de protéines membranaires utilisées comme marqueurs de différenciation ou de maturation.

3.2. Marqueurs de différenciation

- CD45

CD45 fut le premier récepteur transmembranaire identifié ayant une action tyrosine phosphatase ⁽⁶⁹⁾. Il est présent à la surface des leucocytes et particulièrement des lymphocytes. Chez l'homme, une déficience de ce récepteur suite à une mutation entraîne une immunodépression congénitale ⁽⁷⁰⁾. Des travaux sur des souris déficientes pour ce récepteur ainsi que sur une lignée lymphocytaire T provenant d'une leucémie humaine ayant perdu l'expression de ce récepteur ont démontré son rôle essentiel dans la transduction du signal d'activation des lymphocytes ^(71,72).

Le récepteur CD45 se caractérise par l'existence de plusieurs isoformes issues d'un épissage alternatif des exons A, B et C de l'ARNm. Cet épissage alternatif entraîne

une modification du domaine extracellulaire, avec une isoforme courte dénommée CD45RO, ayant perdu les trois exons, et une isoforme longue ou CD45RA, possédant les 3 exons. Il existe également des isoformes intermédiaires possédant différentes combinaisons de deux des trois exons (Figure 1).

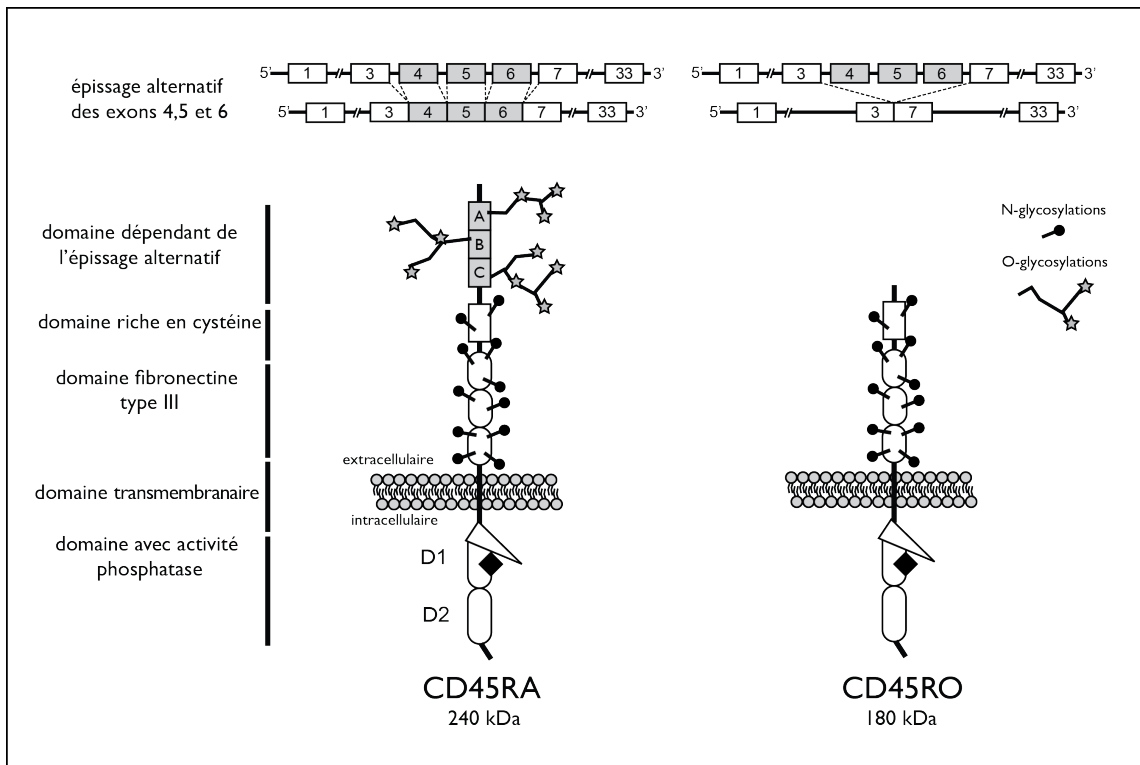


Figure 1 **Épissage alternatif du gène CD45 et structure de la protéine transmembranaire**

L'épissage alternatif des exons 4, 5 et 6 (désignés A, B et C) du gène CD45 conduit à l'existence de plusieurs isoformes de la protéine transmembranaire. Seules les isoformes RABC (ou RA) et RO sont représentées, mais des quantités variables d'isoformes intermédiaires (RAB, RBC et RB) peuvent coexister à la surface des lymphocytes T. (adapté de ⁷³).

La représentation des différentes isoformes de la protéine à la surface du lymphocyte T régulerait l'activité tyrosine phosphatase de CD45. Une surreprésentation de l'isoforme CD45RO entraînerait une dimérisation ayant pour conséquence d'inhiber l'activité tyrosine phosphatase suite à une conformation quaternaire bloquant le site catalytique intracytoplasmique. L'activation du lymphocyte T via le TCR dépend de phosphorylations et de déphosphorylations en cascade de différentes protéines

membranaires et intracytoplasmiques et une inhibition de l'activité tyrosine phosphatase de CD45 pourrait augmenter le seuil d'activation du lymphocyte. Certains auteurs suggèrent que cet effet passerait par une moindre déphosphorylation du site inhibiteur de la tyrosine kinase Lck diminuant la transduction du signal d'activation ⁽⁷³⁾. Par contre, une prédominance de l'isoforme CD45RA empêcherait la formation de dimères, libérant le site catalytique et permettant alors la déphosphorylation du site inhibiteur de Lck. Ceci aurait pour effet d'augmenter la transduction du signal via le TCR, abaissant ainsi le seuil d'activation antigénique du lymphocyte T ⁽⁷⁴⁾.

- CCR7

CCR7, récepteur de chémokines, est une protéine membranaire faisant partie de la

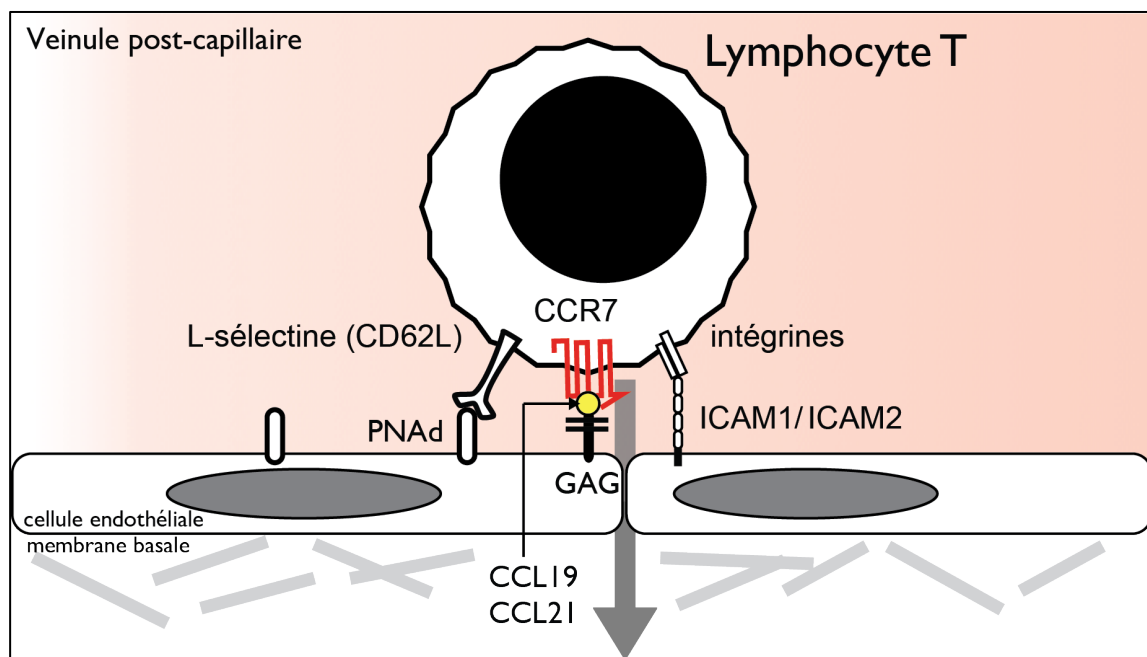


Figure 2 CCR7 et CD62L régulent l'adressage des lymphocytes T

Lors du « rolling » sur la face luminale de l'endothélium des veinules post-capillaires, les récepteurs L-sélectine du lymphocyte T se lient de manière brève aux PNAd (peripheral-node addressins). Ensuite le récepteur CCR7 du lymphocyte T se lie à son ligand CCL19 ou CCL21 immobilisé sur des glycoaminoglycans (GAG). Cette liaison favorise la fixation du lymphocyte en induisant des changements de conformation des intégrines. Celles-ci vont se lier de manière ferme sur les molécules d'adhérence ICAM-1 ou ICAM-2. Après l'immobilisation, le lymphocyte peut migrer à travers l'endothélium et se diriger vers les ganglions lymphatiques ou tout autre lieu où se trouve le ligand CCL19 ou CCL21 (adapté de ⁷⁵).

famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il est exprimé à la surface de certains lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules dendritiques matures. Ses ligands sont les chémokines CCL19 et CCL21. Des souris déficientes pour le gène *CCR7* présentent une anomalie de l'architecture des organes lymphoïdes secondaires ⁽⁷⁵⁾. Ces observations ont permis de démontrer que CCR7 joue un rôle majeur dans la migration des lymphocytes et des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes secondaires (Figure 2). L'expression de ce récepteur a également été rapportée sur de nombreuses tumeurs et il est probable que cette expression influence l'extension métastatique vers les ganglions drainant la zone tumorale ^(76,77).

- CD62L

CD62L ou L-sélectine est une molécule d'adhésion de la famille des lectines qui est exprimée par les leucocytes. Elle reconnaît les motifs saccharidiques de GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1 ou PSGL-1. Des expériences sur des souris déficientes pour le gène codant pour la L-sélectine ont permis de déterminer le rôle de cette molécule dans l'adhésion et plus précisément dans le mécanisme de « rolling » des leucocytes au niveau des veinules post-capillaires ou « high endothelial venules » (HEV) (Figure 2) ⁽⁷⁸⁾. Elle intervient donc dans l'adressage des leucocytes et particulièrement des lymphocytes vers les tissus non lymphoïdes dans un contexte inflammatoire ⁽⁷⁹⁾.

- CD27

La protéine CD27 fait partie de la famille des récepteurs du « Tumor Necrosis Factor » (TNF). Elle est exprimée par certains lymphocytes T et B ainsi que des cellules NK ⁽⁸⁰⁾. CD70, le ligand de CD27, est exprimé de manière transitoire par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) comme les lymphocytes B et les cellules dendritiques, ainsi que par les lymphocytes T CD4 et CD8. Des stimuli modulant l'expression de

CD70 peuvent provenir de signaux propres à la réaction immune innée comme ceux engendrés par la voie des « Toll-Like Receptor » (TLR) ou de signaux propres à la réaction immune adaptative comme ceux induits par l'IFN γ ⁽⁸¹⁾.

Chez les lymphocytes T et B, l'interaction entre CD27 et CD70 a un effet de co-stimulation. Des observations récentes chez l'homme montrent qu'un déficit congénital de CD27 entraîne une hypogammaglobulinémie avec un risque accru de virémie chronique à EBV ⁽⁸²⁾. Ce tableau est compatible avec un dérèglement de la fonction lymphocytaire T ainsi que la réponse B dépendant de CD4. La co-stimulation induite par l'interaction CD27-CD70 joue un rôle essentiel dans l'expansion des lymphocytes T naïfs après le premier contact antigénique et surtout dans l'obtention d'une mémoire lymphocytaire T ⁽⁸³⁾.

Il est intéressant de noter qu'une stimulation chronique via l'interaction CD27-CD70 semble également entraîner un état d'immunodéficience. En effet dans un modèle de souris exprimant le ligand CD70 de manière constitutive, des auteurs ont observé une conversion progressive des lymphocytes T naïfs vers un état effecteur ou mémoire avec finalement une déplétion complète en lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces souris ont présenté des surinfections opportunistes caractéristiques d'un statut de déficience immunitaire ⁽⁸⁴⁾.

- CD28

Les travaux de Schwartz ont montré il y a plus de 20 ans que la stimulation du lymphocyte T nécessite deux événements : (1) un premier signal transmis par l'interaction TCR-HLA, et (2) un second signal ou co-stimulation en plus de la stimulation antigénique. En cas d'absence du second signal ou co-stimulation, le lymphocyte T non seulement ne s'active pas, mais rentre dans un état d'anergie rendant

inefficaces des stimulations ultérieures ⁽⁸⁵⁾. CD28 a été une des premières molécules identifiées comme récepteur de co-stimulation sur le lymphocyte T naïf ⁽⁸⁶⁾. CD28 est co-localisé avec le TCR dans la synapse immunologique et peut se lier à B7-1 ou B7-2 présents à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. L'interaction de CD28 avec ses ligands transmet un signal intracellulaire en synergie avec le signal transmis via le TCR. La co-stimulation via CD28 a pour effet principal de favoriser la survie des lymphocytes T après leur activation initiale ⁽⁸⁷⁾. Leur expansion clonale ultérieure serait également favorisée, entre autre via la production de la cytokine IL-2 ⁽⁸⁸⁾.

Le récepteur « cytotoxique T-lymphocyte antigen-4 » (CTLA-4) est étroitement associé à la fonction de CD28. Il est également transitoirement présent à la surface des lymphocytes T activés et exerce une fonction inverse au récepteur CD28 en inhibant la transduction du signal via le TCR. Il se lie également à B7-1 et B7-2 en rentrant donc en concurrence avec CD28 ⁽⁸⁹⁾.

3.3. Modèles de différenciation des lymphocytes T CD8 et CD4

Au cours des années 1990, un des premiers marqueurs utilisés pour distinguer des sous-populations lymphocytaires T fut CD45 et ses différentes isoformes. Il avait été constaté dans des prélèvements de sang de cordon chez des nouveaux nés, que 87% des lymphocytes T CD4 et 93% des lymphocytes T CD8 exprimaient l'isoforme CD45RA ⁽⁹⁰⁾. Par ailleurs, les lymphocytes T CD45RO semblaient proliférer rapidement face à un rappel antigénique, capacité qui caractérise les lymphocytes mémoire. CD45RA fut donc proposé pour identifier les lymphocytes T naïfs et CD45RO pour identifier les T mémoire ^(91,92).

Néanmoins, au même moment, l'équipe de Matsuda constatait que certains lymphocytes T CD8 CD45RA⁺ exprimaient l'intégrine « Lymphocyte Function-associated Ag-1 » (LFA-1) ⁽⁹³⁾. LFA-1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité α

et d'une sous-unité β . Son expression et son affinité augmentent après activation du lymphocyte T suite à un contact antigénique, ce qui permet le recrutement des lymphocytes T activés sur les sites enflammés grâce à l'interaction avec la molécule d'adhésion ICAM-1 ^(94,95). L'expression de cette intégrine par certains lymphocytes T CD8⁺ CD45RA⁺ indiquait la présence de cellules T non naïves dans cette sous-population. Les auteurs en ont conclu que CD45RA ne permettait pas d'identifier les lymphocytes T CD8 naïfs de manière exclusive.

En parallèle, Van Lier identifiait CD27 et analysait son expression par les lymphocytes T ⁽⁸⁰⁾. Il avait constaté que dans la population CD4, le récepteur CD27 était exprimé de manière constitutive par toute la sous-population CD45RA, et que cette expression constitutive s'éteignait après activation *in vitro*, parallèlement à l'acquisition du phénotype CD45RO. Par contre, dans la population CD8, une fraction de la population CD45RA⁺ n'exprimait pas CD27 (Figure 3) ^(96,97). Ces observations vont

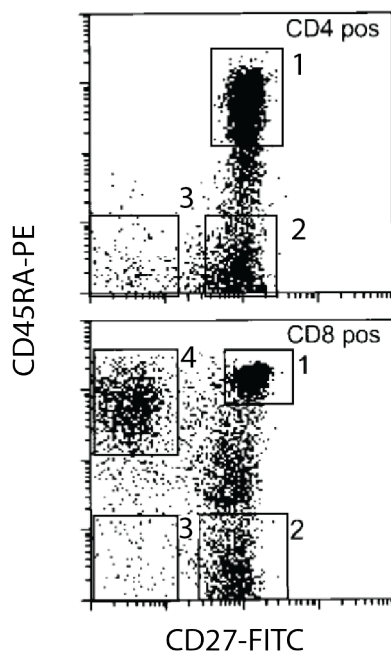


Figure 3 L'expression de CD27 et CD45RA permet de distinguer différentes sous-populations parmi les lymphocytes T

Un marquage simultané avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 ou CD8, CD45RA et CD27 permet de distinguer 3 sous-populations parmi les lymphocytes T CD4. Parmi les lymphocytes T CD8, une 4^{ème} sous-population est identifiée (adapté de ⁹⁷).

dans le même sens que les résultats publiés par Matsuda, confirmant que la population CD8 CD45RA⁺ est hétérogène et qu'elle ne contient pas uniquement des cellules naïves.

Fin des années 1990, les travaux de Lanzavecchia et Sallusto apportèrent des éclaircissements. Ils proposèrent d'utiliser l'expression du récepteur de chemokines CCR7 pour distinguer de nouvelles sous-populations parmi les lymphocytes T. Des marquages combinés avec CCR7 et CD45RA permirent de distinguer trois sous-populations dans le compartiment lymphocytaire CD4, et quatre sous-populations dans le compartiment lymphocytaire CD8 (Figure 4) ⁽⁹⁸⁾.

(1) La fraction CD45RA⁺/CCR7⁺ correspond à la population naïve. Après activation

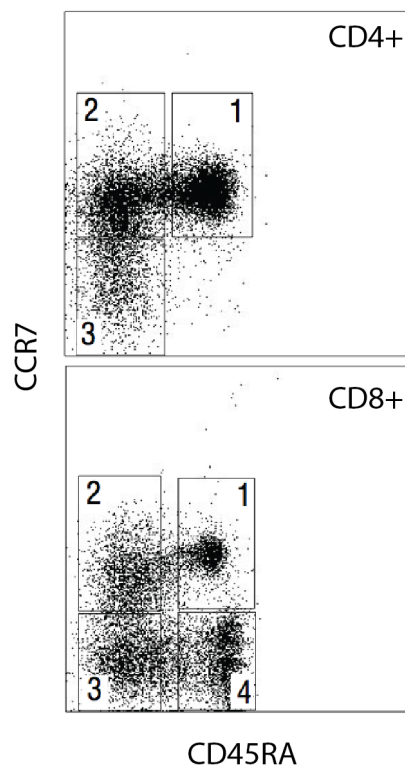


Figure 4 L'expression de CCR7 et CD45RA permet de distinguer différentes sous-population parmi les lymphocytes T

Un marquage simultané avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 ou CD8, CD45RA et CC7 permet de distinguer 3 sous-populations parmi les lymphocytes T CD4. Parmi les lymphocytes T CD8, il existe une 4^{ème} sous-population (adaptaté de ⁹⁸).

antigénique, ces lymphocytes sont capables de proliférer, de produire de l'IL-2, mais pas d'IFN γ .

- (2) La fraction CD45RO⁺ ou CD45RA⁻/CCR7⁺ distingue une première sous-population parmi les lymphocytes T considérés jusque là comme étant des lymphocytes mémoire. Ces cellules expriment également CD62-L. Elles ont la capacité de se fixer à l'endothélium des « High Endothelial Venules » (HEV) et grâce au récepteur CCR7, de trans migrer vers les ganglions lymphatiques. Se basant sur l'adressage de ces lymphocytes, les auteurs ont dénommé cette population : « Mémoire Centrale (T_{CM}) » ⁽⁹⁸⁾. Ces cellules, comme les cellules naïves, sont capables de proliférer, de produire de l'IL-2, mais pas de sécréter de l'IFN γ ou de l'IL-4 après activation antigénique. La fraction CD8⁺ n'exprime pas de protéines effectrices comme la perforine ou le granzyme-A. Cette sous-population se distingue des lymphocytes naïfs par des exigences d'activation moindres en terme de co-stimulation. En effet, ces cellules peuvent s'activer même en l'absence de co-stimulation via le récepteur CD28 ⁽⁹⁸⁾.
- (3) La fraction CD45RO⁺ ou CD45RA⁻/CCR7⁻ correspond à l'autre sous-population identifiée par l'équipe de Lanzavecchia parmi les T mémoire. La majorité de ces lymphocytes n'expriment plus CD62-L, et donc ne sont plus capables de migrer vers des ganglions lymphatiques. Ils ont été dénommés « T Mémoire Effecteur (T_{EM}) ». Après activation, ils produisent surtout de l'IFN γ et gardent un potentiel de prolifération, même si celui-ci semble moindre que celui de lymphocytes naïfs. Les cellules CD8⁺ expriment de la perforine.

- (4) La fraction $CD45RA^+/CCR7^-$ ne concerne principalement que le compartiment lymphocytaire $CD8^+$. Après activation, ces cellules produisent surtout de l' $IFN\gamma$, et elles contiennent d'importantes quantités de perforine. Cette sous-population n'a pas reçu de dénomination initialement et sera plus tardivement qualifiée de « T mémoire effecteurs $CD45RA^+$ » (T_{EMRA}). De nombreux auteurs considèrent qu'elle contient les lymphocytes T $CD8$ ayant les fonctionnalités d'effecteurs terminaux, correspondant à un stade ultime de différenciation (Figure 5) ⁽⁹⁹⁾.

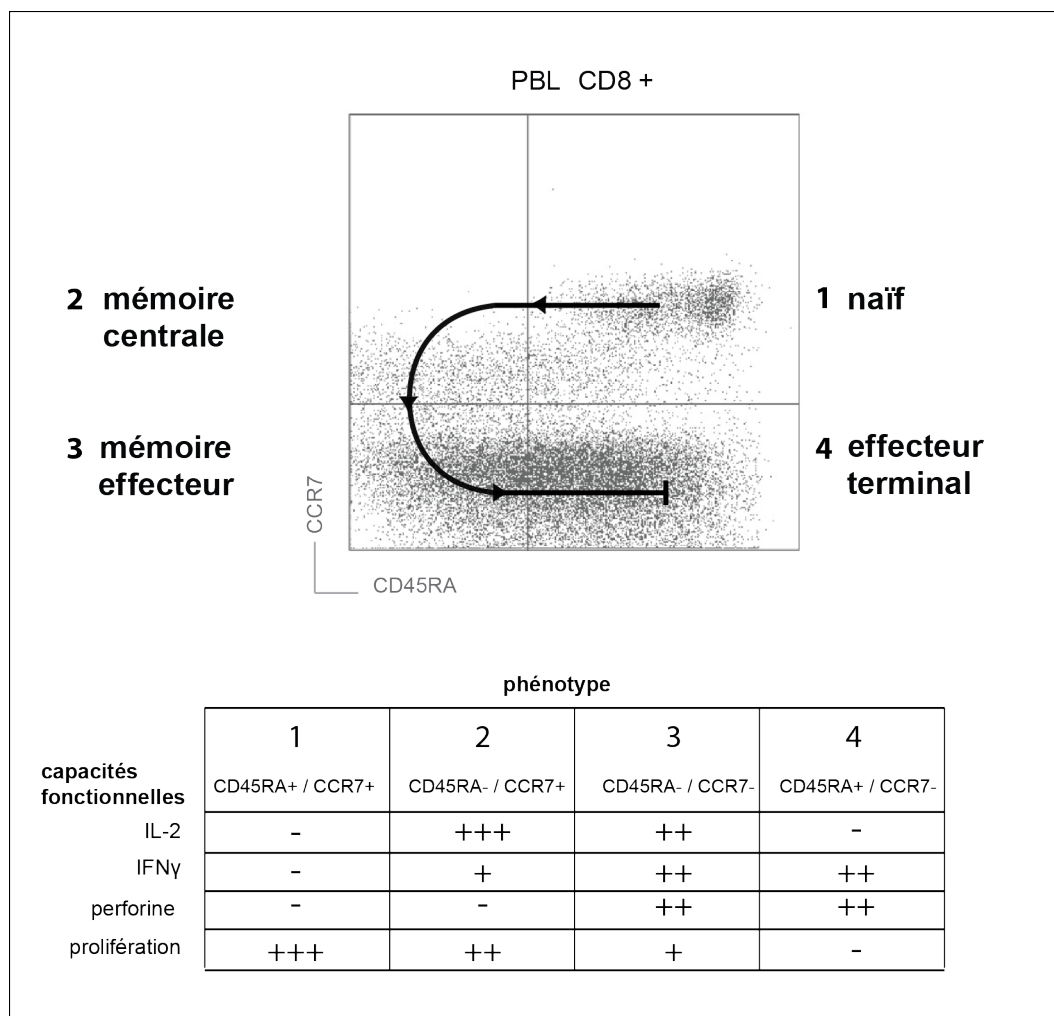


Figure 5 **Modèle de différenciation basé sur le phénotype CCR7 et CD45RA**

L'expression de CCR7 et CD45RA par les lymphocyte T $CD8$ distingue 4 sous-populations. Celles-ci ont été associées à différents états différenciation ⁽⁹⁸⁾. Un modèle propose une différenciation linéaire entre les 4 sous-populations, représentée par la ligne noire ⁽⁹⁹⁾. Les caractéristiques phénotypiques ainsi que les capacités fonctionnelles principales de chaque sous-population sont reprises dans le tableau. La population $CCR7^- / CD45RA^+$ est supposée correspondre aux lymphocytes T $CD8$ ayant atteint un état de différenciation terminal sans aucune possibilité de prolifération.

Les observations de Lanzavecchia confirment donc les suspicions soulevées quelques années auparavant sur l'hétérogénéité de la sous-population de lymphocytes T CD8 exprimant CD45RA, qui contient de fait une population naïve mais également une population non naïve ayant des caractéristiques effectrices.

Au début des années 2000, les sous-populations lymphocytaires T proposées par Lanzavecchia sont revues et précisées suite à des travaux analysant la différenciation des CD8 dirigés contre les virus HIV-1, Epstein-Barr virus (EBV), cytomégalovirus (CMV) et le virus de l'hépatite C (HCV) chez des patients infectés par un ou plusieurs de ces virus. Les auteurs distinguent 4 sous-populations de CD8 en combinant CD27, CD28, CD45RA et CCR7 en tant que marqueurs phénotypiques ⁽¹⁰⁰⁾. La première sous-population exprime le phénotype CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺/CCR7⁺ et correspond aux CD8 naïfs. La deuxième sous-population, CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁻/CCR7⁻, a perdu l'expression de CD45RA au profit de l'isoforme CD45RO et est dénommée « early differentiated cells ». Elle correspond aux lymphocytes T CD8 ayant une capacité de prolifération importante mais de faibles capacités effectrices. Ayant perdu l'expression de CD28, la troisième sous-population CD28⁻/CD27⁺/CD45RA⁻/CCR7⁻, dénommée « intermediate differentiated cells » contient des lymphocytes T CD8 ayant un potentiel prolifératif encore présent et des capacités effectrices plus marquées avec production de perforine et de granzyme-A. Finalement, la quatrième sous-population, CD28⁻/CD27⁻/CD45RA⁺/CCR7⁻, a perdu l'expression de CD27 et réexprime CD45RA. Elle est dénommée « late differentiated cells » et contient les lymphocytes T CD8 effecteurs sans capacité de prolifération, parvenus à un état supposé de différenciation terminale. Dans une publication signée en 2008 par Victor Appay, René A. W. van Lier, Federica Sallusto et Mario Roederer, les auteurs atteignent un consensus et définissent un

modèle de différenciation des lymphocytes T CD8 d'une part et CD4 d'autre part, tenant compte de ces différents marqueurs phénotypiques⁽¹⁰¹⁾.

3.4. Interprétation des réponses T anti-virus et anti-tumeur sur la base des modèles de différenciation

Ces différents modèles de différenciation ont été utilisés pour caractériser et comparer les réponses lymphocytaires observées dans de nombreux contextes pathologiques, comme des infections virales et des pathologies cancéreuses.

- Pathologies virales :

Champagne et Pantaleo ont rapporté en 2001 une analyse phénotypique comparative des CD8 dirigés contre différents épitopes du virus HIV et contre la protéine pp65 du virus CMV chez des patients co-infectés par les deux virus et n'ayant jamais reçu de traitement anti-HIV⁽⁹⁹⁾. Ils ont évalué *ex vivo* l'expression de CCR7 et de CD45RA à la surface des lymphocytes CD8 anti-HIV et anti-CMV détectés grâce à des tétramères spécifiques. 72% des CD8 dirigés contre le virus HIV étaient contenus dans la sous-population CD45RA⁻/CCR7⁻. Chez ces mêmes patients, seulement 38% des CD8 dirigés contre la protéine pp65 du virus CMV étaient contenus dans cette même sous-population. Par contre, plus de 50 % d'entre eux étaient CD45RA⁺/CCR7⁻. Des analyses de prolifération *ex vivo* suite à une stimulation spécifique de ces CD8 antiviraux semblaient indiquer que la population CD45RA⁺/CCR7⁻ était incapable de proliférer. Les auteurs en ont déduit que la sous-population CD8 CD45RA⁺/CCR7⁻ correspondait au stade « d'effecteurs terminaux » avec des lymphocytes CD8 ayant perdu toute capacité de prolifération. Ils proposèrent alors un modèle de différenciation linéaire selon la séquence : cellules naïves CD45RA⁺/CCR7⁺ → mémoire centrale CD45RA⁻/CCR7⁺ → mémoire effectrice CD45RA⁻/CCR7⁻ → effecteur terminal CD45RA⁺/CCR7⁻. La sous-représentation des CD8 antiviraux ayant un phénotype

CD45RA⁺/CCR7⁻ chez les malades infectés par le virus HIV fut interprétée comme un déficit en lymphocytes T CD8 effecteurs. Ils en ont déduit une anomalie dans le processus de différenciation des CD8 dirigés contre le virus HIV.

Les analyses phénotypiques de lymphocytes T CD8 dirigés contre différentes protéines du virus EBV ont révélé une complexité accrue par rapport au modèle proposé par Champagne et Pantaleo. La réponse CD8 dirigée contre différentes protéines du virus EBV a été analysée lors de la phase aigüe de la primo-infection. Lors de la primo-infection, le virus EBV pénètre via l'oropharynx où il se multiplie, entraînant parfois une symptomatologie clinique caractéristique connue sous le nom de mononucléose. Le virus atteint ensuite le compartiment sanguin où il infecte les lymphocytes B. D'un point de vue immunologique, cette phase aigüe se caractérise par l'apparition de nombreux antigènes dits « lytiques », issus de protéines intervenant lors du cycle réplicatif du virus. Après guérison de la primo-infection, survient la phase de latence au cours de laquelle le virus persiste dans l'oropharynx et dans des lymphocytes B, sans aucune symptomatologie clinique. Au cours de cette phase de latence, il n'y a pratiquement plus de réplication virale mais certaines protéines virales continuent d'être exprimées par les lymphocytes B, entraînant la persistance d'antigènes viraux, dits de « latence ». Par contre, les antigènes lytiques ne sont pratiquement plus présents pendant cette phase ⁽¹⁰²⁾. En 2002, Hislop et Rickinson constataient que lors de la primo-infection, la majorité des CD8 anti-EBV étaient dirigés contre des antigènes lytiques et une minorité contre des épitopes latents. Lors de cette phase aigüe, tous les CD8 avaient un phénotype CD45RA⁻/CCR7⁻, quelle que soit leur spécificité. Pendant la phase de latence, les CD8 dirigés contre des antigènes lytiques acquéraient un phénotype CD45RA⁺/CCR7⁻. Par contre, les CD8 dirigés contre des antigènes latents gardaient un phénotype CD45RO avec parfois une réexpression de CCR7 ⁽¹⁰³⁾. Ces

résultats indiquent que les variations phénotypiques en terme d'expression de CCR7 et CD45RA par des CD8 antiviraux, semblent non seulement dépendantes du type de virus contre le lequel est dirigée la réponse lymphocytaire, mais également pour un même virus, dépendantes de l'antigène reconnu et de la phase de l'infection. L'interprétation de ces observations est difficile sur base du modèle de différenciation proposé par Lanzavecchia et par Champagne.

- Pathologies tumorales :

Les réponses T spontanées contre des antigènes tumoraux, qui sont observées dans plusieurs types de cancers, ont souvent été interprétées à la lumière de modèles de différenciation des lymphocytes T. En 2003, Mortarini analysa chez 74 patients atteints de mélanome localisé ou métastatique, le phénotype des lymphocytes T CD8 dirigés contre des antigènes dérivés de protéines de différenciation mélanocytaire Melan-A/MART1, gp100 et tyrosinase ⁽¹⁰⁴⁾. Dans le sang, les lymphocytes T CD8 dirigés contre ces antigènes étaient répartis également entre les sous-populations CD45RA⁺/CCR7⁺, CD45RA⁻/CCR7⁺, CD45RA⁻/CCR7⁻ et CD45RA⁺/CCR7⁻. Dans certains ganglions lymphatiques envahis par la tumeur, des lymphocytes T CD8 dirigés contre ces antigènes et plus particulièrement ceux dérivés de la protéine Melan-A/MART1, étaient retrouvés à des fréquences très élevées allant de 0,4 à 23% des CD8. Dans ces ganglions, plus de 70% de ces lymphocytes étaient CD45RA⁻/CCR7⁻. Dans la même série de patients, lorsque des ganglions non envahis par la tumeur furent analysés, des lymphocytes T CD8 spécifiques des antigènes cités furent également retrouvés mais l'analyse phénotypique sur base de CD45RA et de CCR7 suivait une distribution superposable à celle observée dans le sang. Se basant sur les modèles de différenciation lymphocytaire, les auteurs ont conclu à une carence en effecteurs terminaux dans les ganglions envahis par la tumeur. Ce constat est superposable à celui

proposé par Champagne chez des patients infectés par le virus HIV et laisse sous-entendre que dans les tissus tumoraux, la différenciation des lymphocytes serait bloquée à des stades préterminaux.

Dans le domaine de la vaccination thérapeutique anti-tumorale, les modèles de différenciation lymphocytaire ont également été utilisés comme outil pour caractériser les réponses CD8 dirigées contre les antigènes vaccinaux. De nombreux auteurs s'accordent sur le fait qu'une vaccination thérapeutique efficace doit tout d'abord entraîner une amplification du nombre de lymphocytes contre l'antigène vaccinal. Ces lymphocytes anti-vaccinaux doivent également acquérir des fonctions effectrices leur permettant de détruire les cellules tumorales. Ainsi, l'apparition de lymphocytes T CD8 anti-vaccinaux dans la sous-population $CD45RA^+/CCR7^-$ après une vaccination, est souvent considérée comme une vaccination efficace car ces lymphocytes sont supposés être des effecteurs terminaux ^(105,106,107). Néanmoins, certaines observations semblent remettre en question cette vision des choses. Ainsi en 2006, lors d'un essai de vaccination de patients atteints de mélanome métastatique avec des peptides provenant de la protéine Melan-A/MART-1 et gp100 associés à de l'IFN- α , l'équipe de Rivoltini constata une amplification de la réponse contre les épitopes vaccinaux chez 5 des 7 patients vaccinés. Ils notèrent que cette réponse anti-vaccinale était $CD45RA^+/CCR7^-$ et en conclurent à une vaccination efficace. Néanmoins, chez 3 des patients vaccinés, une fraction des lymphocytes T CD8 anti-vaccinaux était $CD45RA^-/CCR7^-$. Curieusement, les auteurs signalèrent dans leur publication que seuls ces patients présentaient une stabilisation ou une régression tumorale d'un point de vue clinique ⁽¹⁰⁶⁾. Le modèle de différenciation des lymphocytes T CD8 basé sur l'expression de CCR7 et CD45RA tel que proposé dans la littérature (Figure 5 p.34), explique mal ces observations

Résultats

Le travail de recherche avait pour but d'évaluer l'efficacité des vaccins anti-tumoraux par cellules dendritiques. Nous avons tout d'abord déterminé si ces vaccins induisaient une réponse contre l'antigène vaccinal (réponse anti-vaccinale). Afin de mieux comprendre la régression tumorale observée chez un des patients vaccinés, nous avons également évalué la réponse dirigée contre d'autres antigènes tumoraux que celui utilisé dans le vaccin (réponse anti-tumorale).

Parallèlement à ce relevé des lymphocytes intervenant dans la réponse anti-tumorale, nous nous sommes intéressés au profil fonctionnel et à l'état de différenciation des CTL anti-vaccinaux que nous avons isolés du sang des patients. Au delà du contexte de la vaccination anti-tumorale, nos observations nous ont amenés à remettre en question le modèle de différenciation proposé dans la littérature qui est basé sur l'expression des marqueurs CCR7 et CD45RA.

Les résultats des travaux expérimentaux réalisés sont présentés sous forme de trois articles reproduits ci-dessous, accompagnés chacun d'une brève mise en contexte.

1. Article 1: Réponse anti-vaccinale polyclonale après vaccination contre le mélanome avec des cellules dendritiques

Les essais cliniques de vaccination thérapeutique chez des patients atteints de mélanome ont été faits avec différents types de vaccins. Certains expérimentateurs ont eu recours à des cellules dendritiques chargées avec des peptides car les cellules dendritiques sont spécialisées dans la présentation d'antigènes et sont supposées être très immunogéniques. Un premier volet de notre travail de thèse a consisté à analyser l'importance de la réponse lymphocytaire T CD8 dirigée contre un vaccin utilisant des cellules dendritiques matures chargées avec un peptide dérivé de la protéine MAGE-3 et administré à des patients de l'hôpital universitaire d'Erlangen (Allemagne) ⁽⁴⁹⁾.

Nous avons évalué cette réponse anti-vaccinale chez 4 patients dont 3 avaient montré des régressions tumorales. Les CTL anti-vaccinaux ont été recherchés dans le sang par un marquage tétramère soit *ex vivo*, soit après une étape d'amplification *in vitro* en conditions de dilution limite. Les CTL anti-vaccinaux détectés ont ensuite été clonés et amplifiés par culture *in vitro*. Nous avons ainsi pu vérifier leur spécificité antigénique par des tests de reconnaissance *in vitro* et analyser leur diversité en séquençant leurs récepteurs TCR. Les fréquences obtenues selon cette approche ont été vérifiées par des PCR clonotypiques permettant de rechercher la séquence du réarrangement des TCR des CTL anti-vaccinaux directement dans le sang, sans le biais de la culture *in-vitro*.

Il ressort de cette analyse que la vaccination par cellules dendritiques peut induire une réponse anti-vaccinale, et que chez les patients analysés, celle-ci était polyclonale ce qui contrastait avec les réponses monoclonales observées chez les patients vaccinés avec un peptide MAGE-3.A1 ou un virus recombinant codant pour ce peptide. Les fréquences observées dans le sang après vaccination des 3 patients qui ont

présenté des régressions tumorales variaient de 7.10^{-6} à 9.10^{-4} des lymphocytes T CD8 du sang. Chez le 4^{ème} patient analysé il n'a pas été observé de régression tumorale et nous n'avons pas détecté de CTL anti-MAGE-3.A1 dans le sang suggérant une association entre l'existence d'une réponse antivaccinale et la régression tumorale.

**Polyclonal CTL Responses Observed in Melanoma Patients Vaccinated
with Dendritic Cells Pulsed with a MAGE-3.A1 Peptide**

Danièle Godelaine,^{*†} Javier Carrasco,^{*†} Sophie Lucas,^{*†} Vaïos Karanikas,[†]
Beatrice Schuler-Thurner,[‡] Pierre G. Coulie,[†] Gerold Schuler,[‡] Thierry Boon,^{*†}
and Aline Van Pel^{*†}

The Journal of Immunology, 2003, 171: 4893–4897.

^{*}Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels Branch, Brussels, Belgium

[†]Cellular Genetics Unit, Institute of Cellular Pathology, Université de Louvain,
Brussels, Belgium

[‡]Department of Dermatology, University Hospital of Erlangen, Erlangen, Germany

Address correspondence and reprint requests to Dr. Aline Van Pel, Ludwig Institute for
Cancer Research, 74 Avenue Hippocrate UCL 74.59, B-1200 Brussels, Belgium. E-mail
address: aline.vanpel@bru.licr.org

Abstract

Vaccination with mature, monocyte-derived dendritic cells (DC) pulsed with the MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ peptide, which is presented by HLA-A1, has been reported to induce tumor regressions and CTL in some advanced stage IV melanoma patients. We present here a precise evaluation of the level of some of these anti-MAGE-3.A1 CTL responses and an analysis of their clonal diversity. Blood lymphocytes were stimulated with the MAGE-3.A1 peptide under limiting dilution conditions and assayed with an A1/MAGE-3 tetramer. This was followed by the cloning of the tetramer-positive cells and by TCR sequence analysis of the CTL clones that lysed targets expressing MAGE-3.A1. We also used direct ex vivo tetramer staining of CD8 cells, sorting, and cloning of the positive cells. In three patients who showed regression of some of their metastases after vaccination, CTL responses were observed with frequencies ranging from 7×10^{-6} to 9×10^{-4} of CD8⁺ blood T lymphocytes, representing an increase of 20- to 400-fold of the frequencies found before immunization. A fourth patient showed neither tumor regression nor an anti-MAGE-3.A1 CTL response. In each of the responses, several CTL clones were amplified. This polyclonality contrasts with the monoclonality of the CTL responses observed in patients vaccinated with MAGE-3.A1 peptide or with an ALVAC recombinant virus coding for this antigenic peptide.

Introduction

Following the identification of human tumor-specific Ags recognized on human tumors by autologous T cells, a large number of small therapeutic vaccination trials have been performed ⁽¹⁰⁸⁾. A number of metastatic melanoma patients with detectable disease have been vaccinated with Ag MAGE-3_{168–176}, which is encoded by MAGE-3, a gene with a cancer-germline expression profile ⁽¹⁰⁹⁾. This Ag is presented by HLA-A1 and HLA-B35 and will be referred to as Ag MAGE-3.A1 ⁽¹¹⁰⁾.

Patients have been vaccinated with the MAGE-3.A1 peptide alone or with a recombinant canarypox virus (ALVAC) bearing short sequences coding for this MAGE-3.A1 Ag and for the homologous MAGE-1.A1 Ag ^(48,50). Evidence of tumor regression has been observed in 18 of 91 patients who were vaccinated with the peptide or with ALVAC. The CTL responses to the vaccine were studied in most of the HLA-A1 patients who showed evidence of tumor regression and in a number of patients who did not. We resorted to an approach based on stimulation of blood lymphocyte microcultures with the antigenic peptide, followed by labeling of the microcultures with an A1/MAGE-3 tetramer ⁽¹¹¹⁾. Among 10 regressing HLA-A1 patients who were evaluated, 5 showed an anti-MAGE-3.A1 CTL response ^(111,112). The intensity of these responses varied widely, with CTL precursor (CTLp) frequencies ranging from 4×10^{-7} to 10^{-3} among blood CD8 cells. TCR sequence analysis indicated that all of these T cell responses were monoclonal. Among eight patients who did not show tumor regression, two had a CTL response. These numbers suggest that the occurrence of a detectable CTL response shows some degree of correlation with tumor regressions, opening the possibility that a limiting factor for the antitumor effect of the vaccine is the intensity of the CTL response to the vaccine. It is therefore of considerable importance to find out

whether other vaccination modalities produce better CTL responses in cancer patients and, if they do, whether a higher rate of tumor regression ensues.

Dendritic cells are widely accepted to be particularly effective in presenting Ags to T cells ⁽¹¹³⁾. In a recent study, advanced melanoma patients with distant metastases were vaccinated with monocyte-derived dendritic cells matured by autologous monocyte-conditioned medium and pulsed with the MAGE-3.A1 peptide and with one of the recall Ags tetanus toxoid or tuberculin. Six patients of 11 showed evidence of tumor regression ⁽⁴⁹⁾. Anti-MAGE-3.A1 CTL responses were observed in a number of patients. They were evaluated by in vitro restimulation of PBMC with peptide under limiting dilution conditions followed by a specific lysis assay. We have perfected and extended the analysis of the CTL responses of some of these patients with a more sensitive approach involving tetramer sorting and TCR analysis. Our results indicate that these CTL responses are polyclonal.

Materials and Methods

In vitro peptide stimulation of PBMC (mixed lymphocyte-peptide culture (MLPC))

Our method was very similar to that described by Karanikas et al. ⁽¹¹²⁾. PBMC were thawed and incubated at 10^7 cells/ml in Iscove's medium containing 10% AB human serum (HS) at 37°C in the presence of DNase (5 U/ml) for 1 h to get rid of most dead cells. They were then washed and an aliquot was taken to measure the percentage of CD8⁺ cells by labeling with an anti-CD8-FITC (SK1; BD Biosciences, Mountain View, CA) Ab. PBMC were incubated at 5×10^6 cells/ml in Iscove's medium with 1% HS and were pulsed with 20 μ M peptide MAGE-3.A1 (EVDPIGHLY) for 60 min at room temperature. After washing, they were distributed at 1×10^4 – 3×10^4 cells/0.2 ml in microwells containing Iscove's medium with 10% HS, IL-2 (20 U/ml), IL-7 (10 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN). At variance with Karanikas et al. ⁽¹¹²⁾, MAGE-3.A1

peptide at 1 μ M was added to the microculture. In some experiments, IL-4 was added at 10 U/ml. But when we compared cultures performed with or without IL-4, no difference was observed in the number of wells positive for the tetramer. On day 7, 50% of the medium was replaced by fresh medium containing IL-2 and IL-7 and peptide MAGE-3.A1 at 20 μ M. On day 14, an aliquot of the culture was taken for labeling with HLA-A1 tetramers (20 nM each) loaded with peptide MAGE-3.A1 or influenza peptide PB1.A1 and coupled to PE or allophycocyanin, respectively ⁽¹¹¹⁾; after 15 min at room temperature, anti-CD8-FITC was added and incubation was continued for 15 min. The cells were then washed, fixed in 1% paraformaldehyde, and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using the CellQuest software (BD Biosciences). The next day, cells from wells that scored positive for tetramer A1/MAGE-3 and CD8 were collected and labeled as above; cells stained by both the anti-CD8 Ab and the A1/MAGE-3 tetramer were sorted and cloned at one cell per well by using a FACSVantage cell sorter (BD Biosciences). Restimulation conditions were as described below.

Ex vivo sorting of tetramer-positive cells

PBMC were thawed, incubated at 10^7 cells/ml at 37°C in the presence of DNase (5 U/ml) for 2 h, washed, resuspended at 2×10^7 cells/ml and labeled with the tetramers and anti-CD8 Ab as described above. CD8⁺tetramer⁺ cells were sorted, cloned at one cell per well, and restimulated under conditions that were very similar to those described by Karanikas et al. ⁽¹¹²⁾, with some differences in the number of stimulator cells and the cells used as feeder cells. Sorted cells were stimulated by the addition of irradiated (100 Gy) peptide-pulsed (20 μ M for 60 min at room temperature, washed) cells, either 104 MZ2-MEL-3.0 HLA-A1 melanoma cells or 3×10^4 allogenic HLA-A1 EBV-transformed B cells. Irradiated EBV-B cells of another allogenic donor were added as feeder cells

(3×10^4 cells/well) in Iscove's medium containing 10% human AB serum, L- arginine (116 mg/L), L-asparagine (36 mg/L), L-glutamine (216 mg/L), IL-2 (50 U/ml), IL-7 (10 ng/ml), and PHA-A (PHA-HA16, 125 ng/ml; Murex Biotech, bioTRADING, Bierbeek, Belgium).

Specific chromium release assay

Lysis assays were as described previously ⁽¹¹⁴⁾. Briefly, CTL clones were mixed at various ratios starting at 30:1, with 1000 ⁵¹Cr-labeled target cells: allogenic HLA-A1 EBV-B cells pulsed or not with 1 μ M peptide MAGE- 3.A1 or MZ2-MEL-3.0 tumor cells, which express HLA-A1 and MAGE-3. After 4 h, the radioactivity released in the supernatant was measured.

TCR analysis

Total RNA from cloned CTL was extracted with the PURESCRIPT Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) and converted to cDNA with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Merelbeke, Belgium). TCR V α and V β were assessed by PCR amplification by using panels of V α - or V β -specific primers ⁽¹¹⁵⁾ and <http://imgt-.cines.fr>). The rearranged V β TCR sequences were determined for all CTL clones and the V α sequences for some of them.

Clonotypic PCR

A clonotypic detection procedure was set up for CTL clones 1 and 5 of patient 04. The complementarity-determining region 3 (CDR3) sequences were as follows: CTL 1, V α 29/J α 56 (5'-..cttctgtgTTCAAGGTAGGGctggagccaatagtaagctg..) and V β 5-1/J β 2-07 (5'-..tgcgccagcACTCCGGACCActcctacgagcagtacttcgggc..); and CTL 5, V α 29/J α 52 (5'-..cagcaagcgTACGAtgctggtgtactagctatg..) and V β 4-2/J β 2-5 (5'-..agccaagTACTCTGACAA AGGCCGATGGgagaccagta..). Nucleotides that are not

templated by V or J genes are in capital letters. Frequency estimations were based on limiting dilution analysis, applying PCR to cDNA prepared from multiple groups of 10^6 prevaccination or 5000 postvaccination PBMC. We used two PCR amplifications, followed by a run-off reaction. The first amplification used upstream V α or V β primers, mixing primers for CTL 1 and 5, and one downstream C α or C β primer. The amplified TCR α and β products were pooled, and aliquots (10^{-2}) were used in two new multiplex amplifications, one for each clonotype. Each reaction used a V α and a V β primer, downstream to those used in the first amplification, and a J α and a J β primer, each with its 3' end matching the 3' portion of the CDR3 region. A fraction (1/4) of the amplified product was used in a run-off reaction⁽¹¹⁶⁾ starting from antisense fluorescent (5'-6-chlorofluorescein for the CDR3 α and 5'- hexachlorofluorescein for the CDR3 β) primers whose 3' ends complement the 5' portion of the CDR3 region. Size determination of the run-off products was performed with the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer and the GeneScan software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sensitivity of the procedure, one CTL among 10^6 PBMC, was established with dilutions of cDNA from CTL 1 and 5 in cDNA from irrelevant PBMC.

Results and Discussion

We evaluated the CTL response of HLA-A1 metastatic melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with the MAGE- 3.A1 peptide⁽⁴⁹⁾. Two approaches were followed, as outlined in Fig. 1.

In the first approach, which was described previously⁽¹¹¹⁾, blood mononuclear cells were thawed and pulsed with the MAGE-3.A1 peptide (Fig. 1, *left panel*). They were distributed into microcultures of $\pm 10^4$ cells, 10 –20% being CD8⁺ T cells, with the aim of obtaining limiting dilution conditions (<20% positive wells) for anti-MAGE-3.A1 CTLp. After two 7-day cycles of stimulation with the peptide, each of these

MLPC was tested for the presence of CD8⁺ cells labeled by an A1/MAGE-3 tetramer. When a cluster of tetramer-labeled cells was found, the cells were sorted. Even though these cells represent a single T cell clone as a result of the limiting dilution conditions, these cells were cloned to eliminate contaminating lymphocytes. The clones that proliferated were tested for their ability to lyse cells presenting the MAGE-3.A1 Ag, including tumor cells expressing the *MAGE-3* and *HLA-A1* genes. In this “MLPC-tetramer-cloning” approach, we estimated the CTLp frequency by limiting dilution evaluation, counting as positive those microcultures that contained A1/MAGE-3 tetramer⁺ cells from which lytic anti-MAGE-3.A1 CTL clones were obtained.

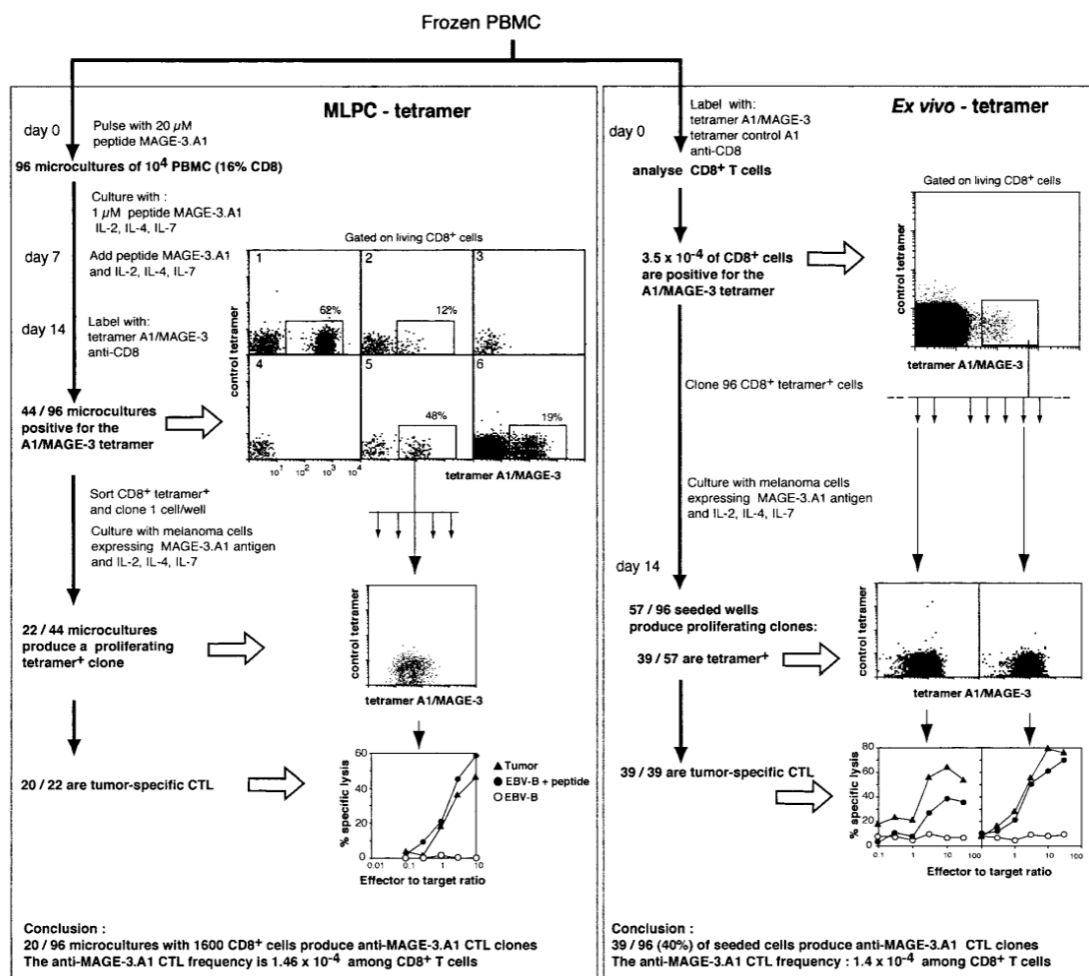


Figure 1. Procedures for the evaluation of anti-MAGE-3.A1 CTLp frequency illustrated by the analysis of the CTL response of patient 04 after the fifth vaccination.

In the second approach, thawed PBMC were assayed immediately with the A1/MAGE-3 tetramer, and the labeled cells were cloned (Fig. 1, *right panel*). Proliferating clones were tested for tetramer binding and lytic ability. In this “ex vivo-tetramer” approach, we estimated the CTLp frequency by multiplying the fraction of the CD8⁺ cells that bound the tetramer with the fraction of cloned cells that multiplied and lysed HLA-A1 target cells expressing gene *MAGE-3*.

To evaluate the diversity of the responses, the TCRβ chain of all the lytic CTL clones was sequenced.

We analyzed the responses of four advanced metastatic patients. Patients 04, 06, and 09 showed clear evidence of tumor regression following vaccination. The fourth patient, 11, did not ⁽⁴⁹⁾.

Regressor patient 04

This advanced melanoma patient had visceral metastases when he received three s.c. and intradermal injections of pulsed dendritic cells followed by two i.v. injections, all at 14-day intervals. All but one of a large number of lung metastases regressed following the vaccination, while metastases present in other locations progressed ⁽⁴⁹⁾.

The preimmunization lymphocytes were tested by the MLPC-tetramer approach. No positive was observed among 6×10^6 CD8 T cells (Fig. 2). With the ex vivo-tetramer approach, two lytic clones were obtained from 10^6 CD8 T cells. The weighed average of these two estimations, 2.8×10^{-7} , is within the range of what we observe in noncancerous individuals ^(117,118).

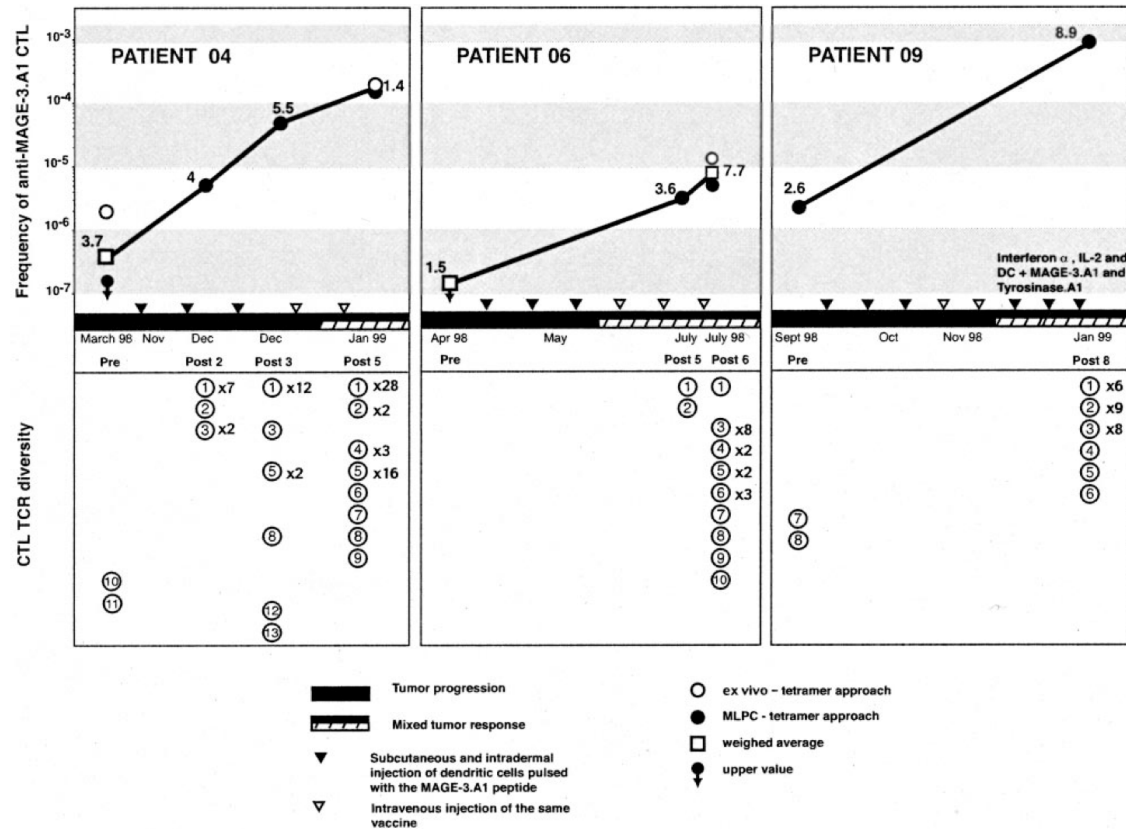


Figure 2. Frequency and diversity of anti-MAGE-3.A1 CTL. Bottom panels, CTL clones, with different numbers for each TCR sequence, and the occurrence of repeated clones. TCR numbering starts at 1 for each patient. Similar numbers assigned to CTL of different patients do not represent TCR similarity.

After three dendritic cell vaccinations, the frequency of anti- MAGE-3.A1 CTLp was evaluated by the MLPC-tetramer approach to be 4×10^{-6} of the CD8 T cells. After the fourth vaccination, a frequency of 5.5×10^{-5} was observed. After the fifth, a frequency of 1.4×10^{-4} was observed and the same frequency was obtained with the ex vivo-tetramer approach. Thus, the frequency of anti-MAGE-3.A1 CTLp rose steadily with successive vaccinations. This is at variance with the previous evaluation of this CTL response, where the CTLp frequency was reported to drop after the i.v. vaccination steps⁽⁴⁹⁾.

The analysis of the TCR β sequences revealed a considerable diversity. Among the 71 CTL clones derived from lymphocytes collected after the third and fifth immunizations, 11 different TCR were observed. The pattern of different clonotypes obtained with the MLPC-tetramer approach was the same as that obtained with the ex vivo-tetramer approach. Since the frequency of the CTLp was more than 100 times the preimmunization level, <1% of the characterized CTL clones ought to represent the preimmunization repertoire. Accordingly, at least 10 of the 11 different CTL clones observed in the postimmunization samples represent CTL that multiplied in response to the vaccine. A subset of clonotypes appears to dominate the response: 47 CTL clones had TCR 1 and 18 had TCR 5 (Fig. 2). We verified that these two groups were homogeneous: nine independently isolated clones of each were shown to have identical TCR α chains. Thus, the CTL response of this patient was highly polyclonal.

The blood frequency of clonotypes 1 and 5 was also evaluated directly by PCR. Clonotypic PCR for the TCR α and β genes were set up and used to test cDNAs derived from freshly thawed groups of lymphocytes. No positive was found in preimmunization blood for CTL 1 and 5, leading for both to a frequency estimate below 4×10^{-7} of CD8 T cells. For the lymphocytes collected after the fifth vaccination, a frequency of 6×10^{-5} was observed for both clonotypes. These frequencies are in line with the frequency of 1.4×10^{-4} obtained by the MLPC-tetramer and the ex vivo-tetramer approaches, considering that CTL clonotypes 1 and 5 constitute $\pm 50\%$ of the clones that were isolated. This indicates that these two clonotypes were not counterselected in the course of their in vitro expansion.

Regressor patient 06

This patient showed a complete regression of one lung and four subcutaneous metastases. However, there was overall progression ⁽⁴⁹⁾. The preimmunization

lymphocytes were tested by the MLPC- tetramer and ex vivo-tetramer approaches. No positive was observed among 2.2×10^6 and 4.4×10^6 CD8 T cells, respectively, leading to a frequency estimate of $<1.5 \times 10^{-7}$ of CD8. After the fifth vaccination, the anti-MAGE-3.A1 CTLp frequency was 3.6×10^{-6} of CD8. After the sixth vaccination, frequencies of 1.4×10^{-5} and 4.2×10^{-6} were observed with the ex vivo-tetramer and MLPC-tetramer approaches, respectively, leading to a weighed average of 7.7×10^{-6} . The TCR of a total of 22 CTL clones were analyzed. Ten different clonotypes were found, one being repeated eight times (Fig. 2). We conclude that this patient made a CTL response to the vaccine, because the frequency of anti-MAGE-3.A1 CTLp was >50 times the frequency observed before vaccination. This frequency implies that >19 of the 20 clonotypes obtained after the sixth vaccination represent CTL that expanded following vaccination. This CTL response is therefore clearly polyclonal.

Regressor patient 09

This patient showed partial regression of one lung metastasis but overall progression of others after the fifth vaccination with MAGE-3.A1-pulsed dendritic cells. This patient was then included in another protocol and received IFN- α , IL-2, and dendritic cells pulsed with MAGE-3.A1 and tyrosinase.A1 peptides. Since the samples from the blood collected after the fifth vaccination were no longer available, we analyzed the anti-MAGE-3.A1 response with the blood collected after eight vaccinations (Fig. 2). A frequency of 9×10^{-4} was obtained by the MLPC-tetramer approach with six different clonotypes, three of them being repeated several times. The preimmunization sample gave a frequency of 2.6×10^{-6} , and the two CTL clones that were obtained were different from those of the postimmunization sample.

Nonregressor patient 11

This patient completed the vaccination schedule without objective tumor regression. Lymphocytes collected after the eighth vaccination were tested by the MLPC-tetramer approach. No tetramer- positive CTL clone was obtained, leading to a frequency estimate below 5×10^{-7} of CD8 T cells.

The results shown here indicate that the level of anti-MAGE- 3.A1 CTL responses obtained upon dendritic cell vaccination varies greatly, as observed with peptide and ALVAC vaccinations. But the polyclonality of the T cell responses elicited by the dendritic cell vaccination is in sharp contrast with the monoclonality or quasi-monoclonality of the T cell responses elicited with antigenic peptide or ALVAC constructs ⁽¹¹¹⁾. This polyclonality was observed even when the level of the T cell response elicited by the dendritic cell vaccination was lower than that observed in some patients immunized with peptide or ALVAC. This suggests that upon dendritic cell vaccination more precursors are activated, but that they do not necessarily enjoy a higher amplification. It will be important to establish definitively whether the average level of the CTL responses observed upon dendritic cell vaccination is higher than that obtained after peptide or ALVAC vaccination.

It is noteworthy that, whereas three patients activated many CTL clones, one patient showed no CTL response at all. At the present time, we do not have any understanding as to the reasons why some patients make a CTL response to tumor Ag vaccines while others do not. When the responses are monoclonal, it is possible to attribute the difference to a stochastic limiting event, which may be difficult to identify, such as the encounter between an initial CTLp and the Ag. On the other hand, when some patients make a polyclonal response whereas others do not make any response, as observed here, different explanations must be found. One possible explanation is that

the prevaccination state of the immune system of the patients is different. For instance, some patients might have acquired immune tolerance for their tumor Ag. Another possible explanation is that the sensitivity of the tumors to immune attack varies widely among patients and that detectable CTL expansions can only be recorded following a successful interaction of responder CTL with the tumor.

Acknowledgments

We thank Vinh Ha Thi, Maria Panagiotakopoulos, and André Tonon for expert technical assistance, Didier Colau for providing us with the tetramers, and Sylvie Hoppe and Suzanne Depelchin for editorial assistance.

2. Article 2: Réponse anti-vaccinale et interactions avec la réponse contre d'autres antigènes tumoraux

Même si les vaccins contre le mélanome peuvent être immunogéniques, les fréquences de CTL anti-vaccinaux dans le sang sont faibles, les valeurs observées les plus élevées ne dépassant pas 1 cellule parmi 1.000 CD8. Afin de mieux comprendre comment cette réponse peut dans certains cas entraîner des régressions tumorales, nous avons analysé la réponse anti-vaccinale chez une patiente atteinte d'un mélanome métastatique, qui avait été traitée par vaccination avec cellules dendritiques autologues chargées de peptides antigéniques dérivés de la protéine MAGE-3, et dont certaines lésions cutanées avaient régressé. Des prélèvements tumoraux de cette patiente étaient disponibles et une lignée tumorale avait été obtenue à partir d'une métastase cutanée. Ceci nous a permis d'élargir notre analyse immunologique à la réponse CTL dirigée contre des antigènes exprimés par la tumeur mais différents de l'antigène vaccinal. Nous avons ainsi pu quantifier la réponse CTL anti-vaccinale et anti-tumorale dans des échantillons sanguins et dans des métastases cutanées. Nous avons suivi ces réponses pendant plus de deux ans après le début du traitement. Une réponse CTL anti-tumorale spontanée polyclonale existait avant le début de la vaccination et celle-ci resta stable après la vaccination. Nous avons constaté qu'une réponse anti-vaccinale apparaissait dans le sang après le début de la vaccination et était amplifiée d'au moins 100x en cours de vaccination. Ces CTL anti-vaccinaux ne semblaient pas se concentrer dans la tumeur. Leur fréquence y était en effet similaire à celle mesurée dans le sang. Nous avons également mis en évidence un clone CTL dirigé contre un nouvel antigène tumoral dérivé de la protéine MAGE-C2 ⁽¹¹⁹⁾ (article en annexe) qui apparaissait en cours de vaccination. Ce dernier était fortement concentré dans les métastases cutanées, sa fréquence dans la tumeur étant plus de 1.000x supérieure à celle mesurée dans le sang.

**Vaccination of a Melanoma Patient with Mature Dendritic Cells Pulsed with
MAGE-3 Peptides Triggers the Activity of Nonvaccine Anti-Tumor Cells**

Javier Carrasco,* Aline Van Pel,* Bart Neyns,† Bernard Lethé,* Francis Brasseur,*
Nicolina Renkvist,* Pierre van der Bruggen,* Nicolas van Baren,* Robert Paulus,§ Kris
Thielemans,‡ Thierry Boon,* and Danièle Godelaine*

The Journal of Immunology, 2008, 180: 3585–3593.

*Ludwig Institute for Cancer Research, Christian de Duve Institute, Cellular Genetics
Unit, Université Catholique de Louvain; Brussels, Belgium

†Department of Medical Oncology, Universitair Ziekenhuis Brussel; Brussels, Belgium

‡Department of Physiology-Immunology, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit
Brussel; Brussels, Belgium

§Centre hospitalier Peltzer-La Tourelle; Verviers, Belgium

Address correspondence and reprint requests to Dr. Danièle Godelaine, Ludwig Institute
for Cancer Research, avenue Hippocrate 74, Université Catholique de Louvain 7459, B-
1200 Brussels, Belgium. E-mail address: daniele.godelaine@bru.licr.org

Abstract

We previously characterized the CTL response of a melanoma patient who experienced tumor regression following vaccination with an ALVAC virus coding for a MAGE-A3 Ag. Whereas anti-vaccine CTL were rare in the blood and inside metastases of this patient, anti-tumor CTL recognizing other tumor Ags, mainly MAGE-C2, were 100 times more frequent in the blood and considerably enriched in metastases following vaccination. In this study we report the analysis of the CTL response of a second melanoma patient who showed a mixed tumor response after vaccination with dendritic cells pulsed with two MAGE-A3 antigenic peptides presented, respectively, by HLA-A1 and HLA-DP4. Anti-MAGE-3.A1 CD8 and anti-MAGE-3.DP4 CD4 T cells became detectable in the blood after vaccination at a frequency of $\pm 10^{-5}$ among the CD8 or CD4 T cells, respectively, and they were slightly enriched in slowly progressing metastases. Additional anti-tumor CTL were present in the blood at a frequency of 2×10^{-4} among the CD8 T cells and, among these, an anti-MAGE-C2 CTL clone was detected only following vaccination and was enriched by >1,000-fold in metastases relative to the blood. The striking similarity of these results with our previous observations further supports the hypothesis that the induction of a few anti-vaccine T cells may prime or restimulate additional anti-tumor T cell clones that are mainly responsible for the tumor regression.

Introduction

The molecular identification of the genes encoding tumor-specific Ags recognized by T cells has led to their use as therapeutic vaccines against cancer. However, when applied to metastatic melanoma patients with detectable tumors, these vaccinations with defined tumor Ags have to date produced only modest results in terms of clinical responses ^(120,121,122,123,124). We vaccinated such patients with MAGE-A3 Ags using various modalities such as the MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ peptide presented by HLA-A1 (MAGE-3.A1), the MAGE-A3 protein with adjuvant, and a recombinant ALVAC poxvirus coding for MAGE-3.A1 ^(48,125,126,50). Of a total of 160 patients treated in these various studies, eight showed complete or partial clinical responses and 19 additional patients showed some evidence of tumor regression, usually mixed responses. An anti-vaccine T cell response was observed in most of the regressing patients vaccinated with ALVAC-MAGE-3.A1 or with dendritic cells (DC) pulsed with the MAGE-3.A1 peptide ^(49,127). But the frequency of anti-vaccine CD8 T cells observed in the blood of these patients was usually $<10^{-5}$ among the CD8 T cells.

We wondered how such a very low number of anti-MAGE-A3 T cells could be responsible for tumor regression and examined the possibility that these T cells were highly concentrated within metastases. In the course of these studies, we also evaluated the total number of T cells present in the blood that were capable of being stimulated by autologous tumor cells and lysing these tumor cells. Such “anti-tumor” T cells were present in all metastatic melanoma patients at frequencies of $\pm 10^{-3}$, well above the frequencies of the anti-vaccine T cells ⁽¹²⁸⁾. Moreover, we observed that these anti-tumor T cells were already present in the blood of these patients at similar frequencies before vaccination. We analyzed in detail the frequency of anti-tumor and anti-vaccine CD8 T cells in the blood and inside metastases of one of these patients. Patient EB81,

who was vaccinated with ALVAC-MAGE-3.A1, showed regression of all skin metastases and underwent resection of an invaded lymph node ⁽⁵⁶⁾. The frequency of anti-MAGE-3.A1 CD8 T cells in the blood was lower than 10^{-7} before immunization and rose to 2.5×10^{-6} (1/400,000) afterward. The anti-tumor CD8 T cells had a frequency of 3×10^{-4} in the blood before vaccination and 3×10^{-3} afterward. Most of the anti-tumor T cells observed after vaccination were directed against Ags that were not the vaccine Ag, many being encoded by the gene *MAGE-C2*, which belongs to the same cancer-germline gene family as *MAGE-A3*. When we examined the frequency of anti-MAGE-3.A1 CD8 T cells in tumor deposits resected after several vaccinations, we observed a frequency of $\pm 1.5 \times 10^{-5}$, representing a modest 6-fold enrichment relative to frequency in the blood. As we observed that the ratio of intra-tumoral CD8 T cells to tumor cells was around 2%, we concluded that having $>10^6$ tumor cells for one anti-vaccine T cell made it almost inconceivable that the latter could be responsible on its own for the observed tumor rejection. In contrast, the anti-MAGE-C2 anti-tumor T cells showed a considerable enrichment in the tumor, with one clonotype constituting almost 10% of the CD8 T cells in the tumor. Altogether, the specific anti-tumor T cells accounted for at least 30% of the T cells present in the tumor. In the progressing metastasis that had been resected before vaccination, we also observed a significant enrichment of various anti-tumor T cell clonotypes, suggesting that the anti-tumor T cells present in the tumor before vaccination were in some state of anergy.

Our working hypothesis to explain these observations is as follows: we believe that melanoma patients mount a spontaneous anti-tumor T cell response well before they are vaccinated and that at one point these lymphocytes become anergic. In regressing patients like EB81, following vaccination a small number of anti-vaccine T cells invade tumor locations, destroy some tumor cells, and thereby induce a focal

reversion of the immunosuppressive tumor microenvironment. This enables the much more numerous anti-tumor T cells to become active. These cells then destroy the bulk of the tumor cells, resulting in tumor regression. Thus, the anti-vaccine T cells serve as a spark, inducing the stimulation of new clonotypes of anti-tumor T cells and possibly reawakening the anergic T cells that resulted from a previous response.

We investigated whether the observations made on patient EB81 could be extended to other patients. In this article we report an analysis of the T cell response of another patient vaccinated with DC pulsed with MAGE-A3 peptides that supports the notion that the main component of the anti-tumoral T cells located in the tumor are not T cells directed against the vaccine but other anti- tumoral T cells.

Materials and Methods

Patient

Melanoma patient LB2586 (HLA-A*0101, -A*2902, -B*2705, -B*4403, -Cw*0202, -Cw*1601, -DRB1*07, -DPB1*0401, -DQB1*0201/02, and -DQB1*0203) was included in a phase I/II study of autologous DC vaccination against the HLA-A1-restricted MAGE-A3 epitope conducted in the Department of Medical Oncology at the Universitair Ziekenhuis Brussel, Brussels, Belgium (protocol no. VUB-02-001). Patients were eligible if their tumor expressed the *MAGE-A3* gene and if disease had a locoregional extension (T1-4N2b; TNM (tumor/lymph nodes/metastasis) staging system of the American Joint Committee on Cancer, Chicago, IL) and no visceral extension other than lung metastasis (M1b). The vaccine consisted of 10 million monocyte-derived autologous DC cultured for 6 days in the presence of GM-CSF and IL-4 and matured for 1 day in medium containing IL-4, GM-CSF, TNF- α , IL-6, IL-1 β , and PGE2⁽¹²⁹⁾. The HLA-A1-restricted MAGE-A3 peptide EVDPIGHLY168–176 (MAGE-3.A1)⁽¹⁰⁹⁾ was added for the last 8 h. Mature DC were collected and pulsed again for 3 h with

the MAGE-3.A1 peptide and tetanus toxoid as the recall Ag. Injections were done in the upper left arm (50% intradermally and 50% s.c.) six times at 2-wk intervals. This protocol was approved by the Ethics Review Committee of the Universitair Ziekenhuis Brussel.

For patient LB2586, the vaccine therapy was further extended. The patient received five additional cycles comprising six injections of MAGE-3.A1-peptide-pulsed DC. From vaccinations 10 to 21, the vaccine also included DC pulsed with the HLA-DP4-restricted MAGE-A3 peptide KKLLTQHFVQENYLEY243–258 (MAGE-3.DP4)⁽¹³⁰⁾. PBMC were collected regularly in the course of vaccination. Several skin metastases were surgically excised and used for the isolation of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from fresh tissues, for analysis of the TCR gene rearrangements, or to establish a tumor cell line.

Cells

Melanoma culture LB2586-MEL.B was obtained from a growing cutaneous metastasis resected after 12 injections (June 2003), and the LB2586- MEL.G cell line was derived from a growing cutaneous metastasis removed after 11 additional vaccinations (October 2004). These cultures were established according to the procedure described by Brasseur⁽¹³¹⁾.

Melanoma cell cultures, EBV-transformed B cells and the K562 cell line were cultured in IMDM (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% FCS (Invitrogen Life Technologies). COS-7 cells were cultured in DMEM (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% FCS. Mixed cultures of lymphocytes and cultures of CTL clones were performed in IMDM supplemented with 10% human serum instead of FCS and 5×10^{-5} M 2-ME. All media were supplemented with L-arginine (116 mg/L), L-asparagine (36 mg/L) and L-glutamine (216 mg/L).

Gene expression analysis of tumor samples and cell cultures

Expression of cancer-germline and melanocytic differentiation genes was assessed by reverse transcription and conventional PCR amplification ^(25,132,133,134,135,136,137).

Analysis of blood anti-vaccine T cells

Anti-MAGE-3.A1 CD8 T cells were isolated from frozen PBMC either by in vitro mixed lymphocyte-peptide culture (MLPC) or by ex vivo sorting of MAGE-3.A1 tetramer-positive cells, as described previously ⁽¹²⁷⁾. Anti- MAGE-3.DP4 CD4 T cells were isolated by ex vivo MAGE-3.DP4 multimer sorting as reported previously ⁽¹³⁸⁾.

Analysis of blood anti-tumor T cells

Blood CD8 lymphocytes were purified from thawed PBMC with anti-CD8 magnetic beads on an autoMACS separator (Miltenyi Biotec). They were used to isolate anti-tumor CTL by mixed lymphocyte-tumor cell culture (MLTC) as described previously ⁽¹¹⁹⁾. Briefly, they were seeded at 200–6,000 cells/well and stimulated with autologous IFN- γ -treated LB2586- MEL.B tumor cells and IL-2 (50 U/ml) (Chiron), IL-4 (3 ng/ml) (produced in our laboratory), and IL-7 (10 ng/ml) (R&D Systems). They were restimulated under the same conditions on days 7 and 14. On day 21, aliquots collected from each microculture were used as effector cells in a cytotoxicity assay; lytic microcultures were used to derive anti-tumor CTL clones that were grown in the presence of irradiated IFN- γ -treated LB2586- MEL.B cells, irradiated allogeneic LG2-EBV-transformed B cells as feeder cells, and cytokines.

Analysis of tumor-infiltrating T cells

Surgically resected cutaneous metastases were used as a source of TIL as described previously ⁽¹¹⁹⁾. To isolate anti-tumor CTL clones, we resorted to the same procedure as that used for analysis of blood anti-tumor T cells.

Cytotoxicity assay

Cytolytic activity was estimated in a chromium release assay as described previously⁽¹¹⁴⁾. Briefly, CTL were mixed at various ratios with 1,000 ⁵¹Cr-labeled target cells; after 4 h, the radioactivity released in the supernatant was measured.

Identification of the Ag recognized by anti-tumor CTL clones

COS-7 cells were cotransfected using the Lipofectamine method (Invitrogen Life Technologies) with a combination of two different plasmids. The first contained one of a series of the patient's HLA class I alleles and the second contained one of a series of cDNA encoding known tumor Ags. After 24 h, transfected cells were incubated with the appropriate resting CTL clone and its activation was detected by measuring TNF- α released in the supernatant, as described⁽¹¹⁹⁾.

TCR analysis of T cell clones

TCR- α and - β gene rearrangements of the T cell clones were amplified by RT-PCR using panels of V α - or V β -specific upstream primers⁽¹¹⁵⁾ and one fluorescently labeled downstream primer (C α -HEX or C β -NED) and analyzed using an ABI PRISM 3100 genetic analyzer equipped with the GeneScan software (Applied Biosystems). PCR products were purified and sequenced using the BigDye Terminator sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) and the ABI PRISM 3100 genetic analyzer to obtain a complete identification of the CDR3 region.

Measurement of clonotype frequency in the blood

A clonotypic detection procedure was set up for anti-MAGE-3.A1 CTL clone 1 (TCR α - and β -chains), anti-MAGE-3.DP4 CD4 T cell clone 2 (TCR β -chain), and anti-MAGE-C2.B44 CTL clone A (TCR α - and β -chains). For each of the three clonotypes we used two nested PCR amplifications followed by a run-off reaction. Accurate size

determination of the run-off products was performed with the ABI PRISM 3100 genetic analyzer and GeneScan software (Applied Biosystems). For each clone, the sensitivity of the procedure was established by diluting its cDNA in cDNA from irrelevant PBMC as previously described ⁽¹²⁷⁾.

In the blood, frequency estimations were based on limiting dilution analysis, applying clonotypic PCR to cDNA prepared from multiple groups of 10^6 prevaccination or 10^4 to 2×10^5 postvaccination PBMC. The frequency of each T lymphocyte clone among either CD8 or CD4 T cells was estimated from the proportion of groups tested positive by clonotypic PCR (after correction for Poisson distribution), knowing the proportion of CD8 or CD4 T cells in PBMC as measured by flow cytometry.

Measurement of clonotype frequency in tumor samples

Total RNA was extracted with the RNeasy kit (Qiagen) from tumor samples resected before and after vaccination and frozen soon after resection. One microgram was reverse transcribed using PowerScript reverse transcriptase (Clontech) and 1 μ M oligo(dT) primer in the presence of 1 μ M SMART II oligonucleotide (Clontech). The number of TCR β -chain transcripts in these samples was estimated by quantitative PCR for the C β region. For each tumor sample, seven groups of ± 50 TCR β -chain transcripts were amplified by PCR with SMART and C β primers to get enough material for analyzing the diversity of TCR- β gene rearrangements inside each group with a panel of 24 V β sense primers ⁽¹¹⁵⁾ and a fluorescently labeled antisense inner C β primer. Accurate size determination of the PCR products was performed with the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer and the GeneScan software (Applied Biosystems). Using this approach we easily identified clonotypes assumed to be repeated, as PCR products of identical size and V β usage were found in independent groups of TCR- β . The actual sequence of TCR- β products from such repeated clonotypes were verified after cloning

into the pcDNA3.1/V5/His-TOPO plasmid used to transform *Escherichia coli* TOP10 (TOPO-TA cloning kit; Invitrogen Life Technologies) and sequencing with the BigDye Terminator sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) and the ABI PRISM 3100 genetic analyzer to obtain a complete identification of the CDR3 region.

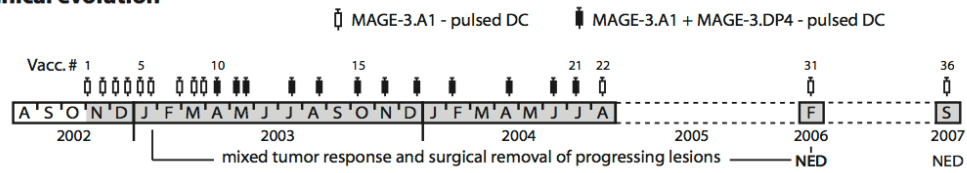
This TCR- β screening was applied to samples of ± 300 TCR β -chains for each tumor sample. Consequently, only TCR- β gene rearrangements present at a frequency of $\pm 1\%$ could be detected. To estimate frequencies below that level, clonotypic PCR for clonotypes 1, 2, and A (TCR β -chains) were applied on multiple fractions of 2×10^3 - 10^4 TCR β -chain transcripts of the same cDNA samples. Frequency estimations based on limiting dilution analysis were reported to the number of TCR β -chains that were analyzed.

Results

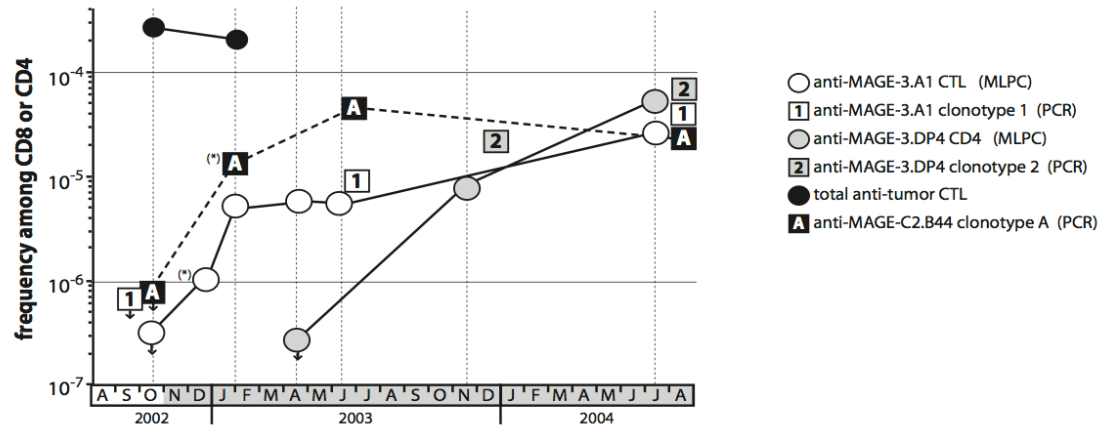
Clinical evolution

Patient LB2586 had a primary melanoma of the right foot resected in June 2000. In April 2002 a number of cutaneous metastases appeared on the right leg. There was no lymph node or visceral extension. Resected lesions showed expression of the gene *MAGE-A3*. Starting in November 2002, the patient received nine vaccinations with 10 million autologous mature DC pulsed with the MAGE- 3.A1 peptide (Fig. 1A). At that time, ± 13 metastases were present on the leg. From April 2003 until July 2004 (vaccinations 10–21), the patient received a mixture of DC pulsed with the MAGE-3.A1 peptide and DC pulsed with the MAGE-3.DP4 peptide.

A Clinical evolution



B Frequencies in the blood



C Diversity in the blood

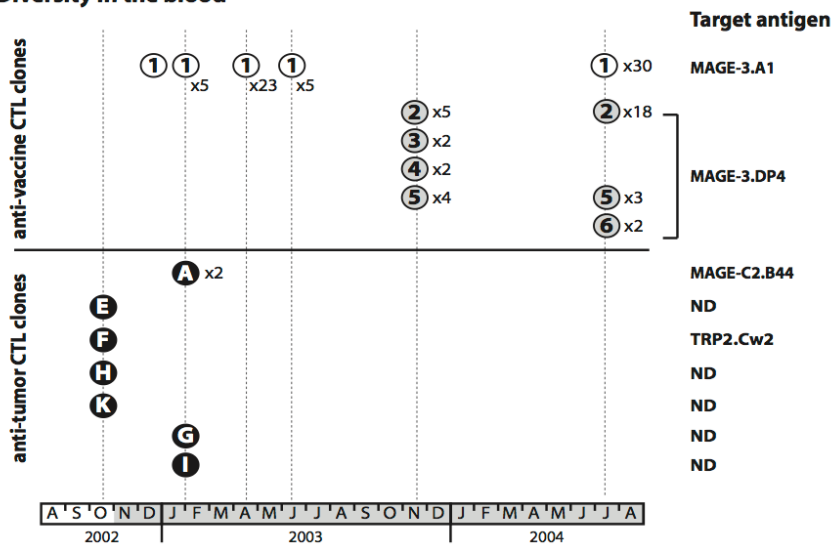


Figure 1. Frequency and diversity of anti-vaccine and anti-tumor T cells in the blood of patient LB2586. A, Clinical evolution of the patient. NED, No evidence of disease. B, Frequencies of anti-vaccine and anti-tumor T cells. Circles refer to frequencies based on in vitro cultures (MLPC), squares refer to frequencies based on clonotypic PCR. All evaluations were conducted under limiting dilution conditions and details are given in Tables I and II. The asterisk (*) indicates that the value is based on a single positive group in the limiting dilution analysis. The frequencies of anti-MAGE-3.A1 CTL and anti-tumor CTL are referred to total blood CD8 T cells, while the frequencies of anti-MAGE-3.DP4 T cells are referred to total blood CD4 T cells. C, Diversity of anti-vaccine (top panel) and anti-tumor (bottom panel) T cells. T cell clones derived from individual microcultures are represented with different numbers (anti-vaccine) or letters (anti-tumor) corresponding to different TCR sequences. The occurrence of repeated clones is also indicated. The target Ag is mentioned; for some clones, it was not determined (ND).

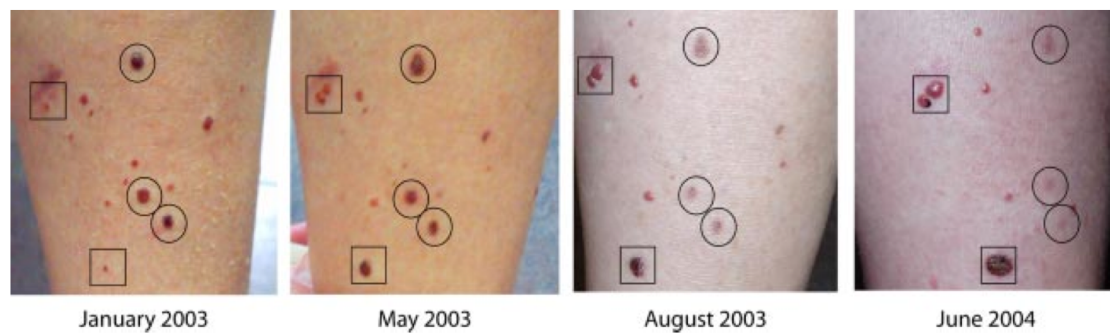


Figure 2. Development of the mixed tumor response in patient LB2586. Regressing lesions on the posterior face of the right leg are encircled. The squares frame lesions that progressed over the same period of time

From August 2004 until September 2007, vaccinations 22–36 consisted of DC pulsed with the MAGE-3.A1 peptide alone. During the first six vaccinations, new lesions appeared and the existing lesions progressed, albeit slowly. In January 2003, a few of the 20 lesions present began to shrink but new ones appeared until August 2003, indicating a mixed tumor response (Fig. 2). By February 2006, nine tumor nodules had regressed. The lesions that did not regress progressed slowly and were all removed by surgery. In February 2006 the patient was tumor free. In September 2007, the patient was still without evidence of disease, with an overall survival of five years after starting vaccination.

Frequency and diversity of anti-vaccine CD8 T cells in the blood

We examined the frequency of the anti-MAGE-3.A1 CTL in blood samples collected at various time points before and during the treatment by the MLPC approach. Groups of thawed PBMC were stimulated with the peptide under limiting dilution conditions. Two weeks later, wells containing CTL able to bind the MAGE-3.A1 tetramer were considered as positive ⁽¹¹¹⁾. In the PBMC sample collected before vaccination, no positives were found among the 2.9×10^6 CD8 T cells that were tested, leading to a frequency of $< 3.4 \times 10^{-7}$ (Fig. 1B). Similar very low frequencies have been observed

previously in noncancerous individuals ⁽¹¹⁸⁾. After vaccination, the frequency increased steadily, reaching a value of 5.6×10^{-6} after nine vaccinations. Fifteen months later, after 20 vaccinations, the frequency rose up to 2.8×10^{-5} of CD8 cells. It remained stable after six additional vaccinations, extending over an additional year (data not shown).

To evaluate the diversity of this anti-vaccine CTL response, the sequence of the rearranged TCR- α and - β genes of independent anti-MAGE-3.A1 CTL clones derived from these blood samples were determined. Of 64 CTL clones examined, a single clonotype was found (referred below as clonotype 1) (Fig. 1C). This monoclonal response was unexpected, because previous patients vaccinated with peptide-pulsed DC had shown a poly- clonal response ⁽¹²⁷⁾.

The blood frequency of clonotype 1 was also evaluated ex vivo by clonotypic PCR with primers specific for the CDR3 region of the TCR- α and - β genes of clonotype 1. The PCR was applied to cDNA derived from freshly thawed, precisely enumerated groups of PBMC sized to apply the limiting dilution principle. The fraction of CD8 T cells in PBMC was estimated by flow cytometry. In PBMC collected before vaccination, the frequency of clonotype 1 was $<8.3 \times 10^{-7}$ of CD8 cells (Fig. 1B). The frequency increased progressively to 7.5×10^{-6} of CD8 cells after 12 vaccinations. After nine additional vaccinations it reached 5.1×10^{-5} . These clonotype frequencies were in good agreement with the frequencies of all anti-MAGE-3.A1 CTL obtained by the MLPC approach described above, which validates both series of measurements.

Frequency and diversity of anti-vaccine CD4 T cells in the blood

We also examined whether specific CD4 T cells had been induced against the MAGE-3.DP4 Ag that was part of the vaccine from injections 10–21. These T cells were isolated from frozen PBMC by ex vivo MAGE-3.DP4 multimer sorting and cloning. Before adding the class II peptide to the vaccine, the frequency of the anti-MAGE-

3.DP4 CD4 T cells was $<3 \times 10^{-7}$. It increased to 8×10^{-6} after six vaccinations including the MAGE-3.DP4 peptide and reached 5×10^{-5} after five additional vaccinations (Fig. 1B). Analysis of the TCR α - and β -chains' diversity indicated that this CD4 T cell response was oligoclonal, with one clonotype (clonotype 2) being clearly dominant as it was present in 18 of 23 CD4 T cell clones that were obtained after vaccination 20 (Fig. 1C). The frequency of clonotype 2 in the blood was evaluated by clonotypic PCR at 2.5×10^{-5} of CD4 T cells after vaccination 16 and 6.6×10^{-5} after vaccination 21, again in agreement with the frequencies obtained by MLPC (Fig. 1B).

For all of these CD8 and CD4 frequencies we provide the precise number of lymphocytes tested and the frequencies estimated in Tables I and II.

Table 1. *Frequencies of anti-MAGE-3.A1 and anti-MAGE-C2.B44 CD8 T cells and anti-MAGE-3.DP4 CD4 T cells measured in the blood (PBMC)^a*

	2002				2003				2004			
	October	December	January	April	June	October	November	December	February	June	August	
CD8 anti-MAGE-3.A1 (clonotype 1) MLPC	$<3.4 \times 10^{-7}$ (2.9×10^6)	1.1×10^{-6} (8.8×10^5)	5.2×10^{-6} (9.7×10^5)	5.6×10^{-6} (1.4×10^6)	5.5×10^{-6} (9.2×10^5)					2.8×10^{-5} (5.8×10^5)		
α - and β -chains clonotypic PCR	$<8.3 \times 10^{-7}$ (1.2×10^6)				7.5×10^{-6} (2.8×10^5)						5.1×10^{-5} (2.8×10^5)	
CD8 anti-MAGE-C2.B44 (clonotype A) α - and β -chain clonotypic PCR	$<8.3 \times 10^{-7}$ (1.2×10^6)		1.5×10^{-5} (7×10^4)		4.2×10^{-5} (2.8×10^5)						2.8×10^{-5} (2.8×10^5)	
CD4 anti-MAGE-3.DP4 (clonotype 2) Ex vivo tetramer				$<3 \times 10^{-7}$ (3.5×10^6)			8×10^{-6} (1.2×10^6)			5.4×10^{-5} (5.5×10^5)		
β -chain clonotypic PCR								2.5×10^{-5} (1.2×10^6)			6.6×10^{-5} (1.2×10^5)	

^a Values correspond to frequency among CD8 or CD4 T cells, respectively. The number of CD8 or CD4 T cells analyzed to establish the frequencies are represented in parentheses.

Table II. Frequencies of anti-MAGE-3.A1 and anti-MAGE-C2.B44 CD8 T cells and anti-MAGE-3.DP4 CD4 T cells measured in tumor samples (cutaneous in transit metastases)^a

	2002				2003				2004			
	October	December	January	April	June	October	November	December	February	June	August	
CD8 anti-MAGE-3.A1 (clonotype 1) β-chain clonotypic PCR	3.3×10^{-6} (3×10^5)				$<1.4 \times 10^{-5}$ (7×10^4)	1.5×10^{-5} (7×10^4)			6.7×10^{-5} (7×10^4)			
CD8 anti-MAGE-C2.B44 (clonotype A) β-chain clonotypic PCR ⁽ⁱ⁾ or TCRβ screening ⁽ⁱⁱ⁾	6.2×10^{-6} (i) (3×10^5)				1.5% (ii) (400)	0.7% (ii) (151)			2.2% (ii) (387)			
CD4 anti-MAGE-3.DP4 (clonotype 2) β-chain clonotypic PCR	$<1.2 \times 10^{-5}$ (8×10^4)					$<1.2 \times 10^{-5}$ (8×10^4)			1.4×10^{-5} (7×10^4)			

^a Values correspond to frequency among TCR β-chains. The number of TCR β-chains analyzed to establish the frequencies is represented in parentheses.

Frequency and diversity of anti-tumor T cells in the blood

It was possible to derive a melanoma cell culture from a progressive metastasis resected after 12 vaccinations. This LB2586-MEL.B cell culture presented a pattern of expression of cancer-germline and melanocytic differentiation genes reflecting the pattern of expression of cutaneous metastases (Table III). We estimated the frequency of blood CTL capable of lysing the tumor cells. We stimulated groups of CD8 T cells sorted from PBMC with irradiated autologous tumor cells under limiting dilution conditions. After three weekly restimulations, microcultures that lysed autologous tumor cells but not autologous EBV-transformed B cells or the NK cell target K562 were considered to contain anti-tumor CTL. In a blood sample collected before vaccination, anti-tumor CTL were found at a frequency of 2.9×10^{-4} (Fig. 1B). After six vaccinations, anti-tumor CTL were found at a similar frequency, i.e., two orders of

Table III. Expression of cancer-germline and melanocytic differentiation genes in tumor samples from patient LB2586

	Before Vaccination		After Vaccination		
	Cutaneous Metastases		Cutaneous Metastases	Cell Cultures	
	A	B		2586-MEL.B	LB2586-MEL.G
<i>MAGE-A1</i>	—	—	—	(+)	+++
<i>MAGE-A3</i>	+	++	+	+++	+++
<i>MAGE-A4</i>	—	(+)	—	++	+
<i>MAGE-A10</i>	—	—	(+)	(+)	++
<i>MAGE-C2</i>	+	+	+	++	+++
<i>LAGE-1</i>	—	—	—	—	—
<i>NY-ESO1^{LAGE-2}</i>	—	—	—	—	—
<i>NAI7-A</i>	++	++	++	+++	+++
Tyrosinase	+++	+++	+	+++	+++
<i>Melan-A^{MART-1}</i>	+++	+++	++	+++	+++
<i>gp100</i>	+	++	—	+	—

Cutaneous metastases were resected in August 2002 (before vaccination, A and B) and in October 2003 (after vaccination). Cell cultures were derived from cutaneous metastases resected in June 2003 (LB2586-MEL.B) and October 2004 (LB2586-MEL.G). Gene expression levels were evaluated semiquantitatively using the intensity of the bands obtained by separating PCR products in agarose gel. The results are expressed as + + +, + +, +, or (+) if the amount of the PCR-amplified product is equal or greater than that obtained with 1/1, 1/3, 1/9, and 1/27 dilutions of the reference RNA used for each gene. Lower levels of expression are scored negative. Reference RNA is extracted from tumor cell lines expressing the relevant genes.

magnitude higher than that of the anti-vaccine CTL at the same time point.

Stable CTL clones were derived from microcultures that displayed a high level of anti-tumor lytic activity with the aim of establishing their diversity and identifying their target Ags. Four different anti-tumor CTL clones were derived from independent microcultures of CD8 T cells collected before vaccination (Fig. 1C). We attempted to identify the Ags recognized by these CTL clones by coculturing them with COS-7 cells transiently cotransfected with plasmids containing cDNA of HLA molecules corresponding to the patient's alleles together with the cDNA obtained from a set of genes known to encode tumor Ags. One of these CTL clones (clonotype F) recognized a melanocytic differentiation Ag encoded by *TRP2/DCT* and presented by HLA-Cw*0202, but the epitope was not further characterized due to the very poor growth of the CTL clone. The other three remained unidentified. Four CTL clones were derived from independent microcultures of CD8 T cells collected after six vaccinations. Two of them had the same clonotype, referred to below as clonotype A, which was found to recognize an epitope encoded by the cancer-germline gene *MAGE-C2* and presented by HLA-B*4403, SESIKKKVL⁽¹¹⁹⁾.

The MLPC-tetramer approach could not be used to determine the blood frequency of this anti-MAGE-C2.B44 CTL A because the appropriate tetramer could not be produced. We therefore resorted to clonotypic PCR amplifications of the α and β -chains of the TCR of CTL A. Before vaccination, clonotype A frequency was $<8.3 \times 10^{-7}$ of CD8 T cells (Fig. 1B and Table I). Three months after the onset of vaccinations that frequency was raised to 1.5×10^{-5} and five months later to 4.2×10^{-5} .

We checked that the absence of an anti-MAGE-C2 response before vaccination was not due to the absence of expression of *MAGE-C2* in the tumor. The metastases

collected before and after vaccination expressed both *MAGE-A3* and *MAGE-C2* (Table III).

Contrasting frequencies of anti-tumor and anti-vaccine T cells in metastases

At three different time points in the course of the vaccination, surgically resected progressing lesions were used to prepare a single cell suspension and obtain TIL. After cloning these TIL and checking their tumor reactivity we set out to identify their target Ag specificity and their TCR sequences. Eighteen clones were isolated (Fig. 3A). Among them, 10 recognized the same MAGE-C2.B44 epitope: eight clones belonged to clonotype A and two additional clones had a different TCR. The target of the eight remaining clones (of seven different clonotypes) could not be identified.

To get more insight into the frequency of selected T cell clones within tumors, RT-PCR-based approaches were used starting from frozen fragments of three slowly progressing metastases resected in the course of the vaccinations (Fig. 3B). RNA was extracted from the frozen tumor fragments and reverse transcribed with an oligo(dT) primer in the presence of the SMART II oligonucleotide. The number of cDNA coding for TCR β -chains was estimated by quantitative PCR with C β primers. From each metastasis, seven aliquots of the cDNA corresponding to ± 50 C β molecules were amplified by PCR before TCR- β screening. We examined the frequency of the V β -chain of anti-MAGE-C2.B44 clonotype A amplified with a primer corresponding to the appropriate V β 19 chain and a C β primer. Sequencing of the products indicated that clonotype A was found in many cDNA groups obtained from the three postvaccination metastases. Its frequency was estimated near to 1% of the TCR- β sequences (Fig. 3B and Table II). This frequency is >1,000 times higher than the frequency of clonotype A in the blood, suggesting a considerable enrichment of this CTL in the tumor. The analysis of the groups of cDNA amplified with primers corresponding to other V β -

chains revealed that a total of 10 clonotypes were found at a frequency near to 1%, suggesting that several other anti-tumor T cells clones are considerably enriched in the tumor relative to the blood.

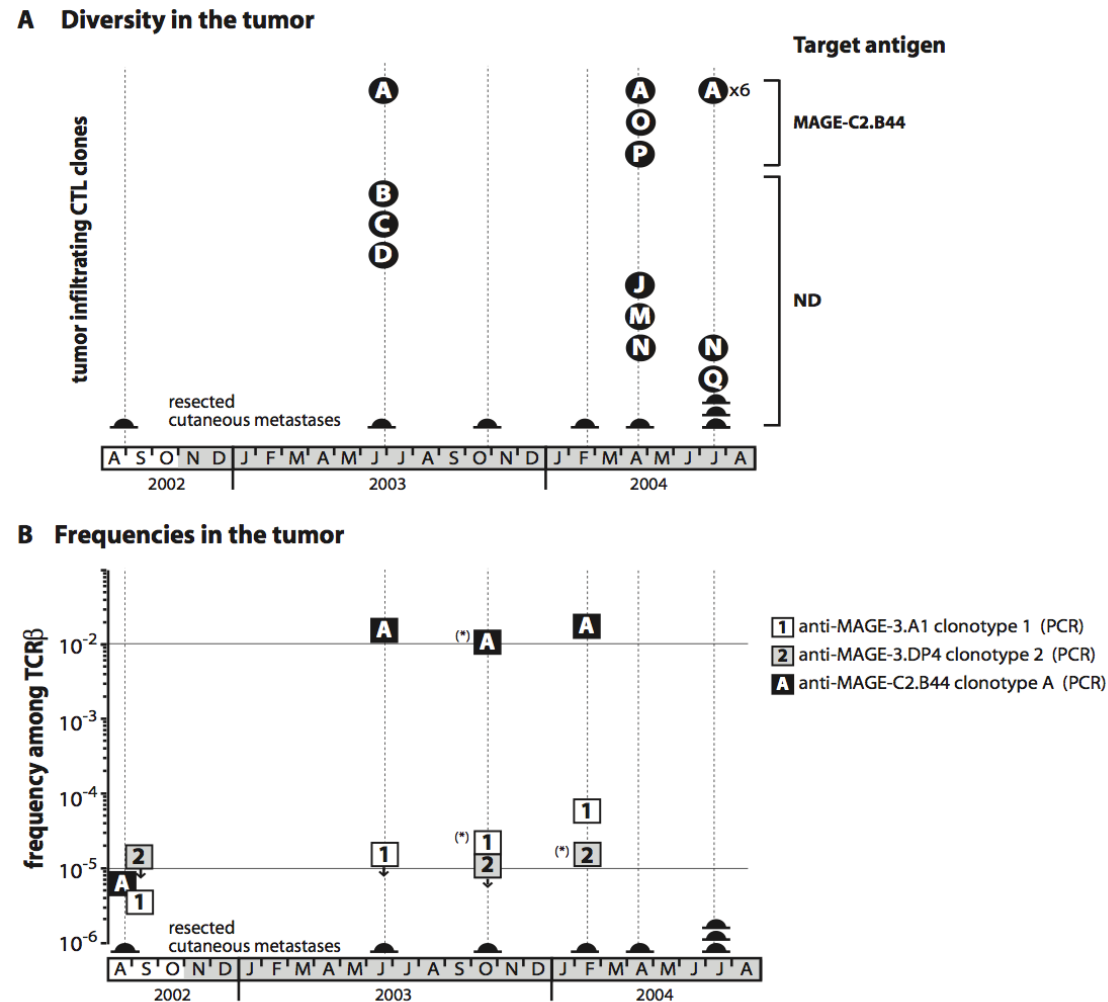


Figure 3. Frequency and diversity of anti-vaccine and anti-tumor T cells in various skin metastases of patient LB2586. *A*, Diversity of anti-tumor T cells obtained from freshly prepared single cell suspensions from tumor fragments. TIL clones emerging from individual microcultures restimulated with tumor cells are referred to by different capital letters corresponding to different TCR sequences. The occurrence of repeated clones is indicated. The target Ag is mentioned; for some clones, it was not determined (ND). *B*, Frequency of anti-vaccine and anti-tumor TCR β -chains. Total RNA was extracted from fragments of resected frozen metastases and the total number of TCR β -chain transcripts was quantified. The frequencies of TCR β -chains of anti-vaccine clonotypes 1 and 2 and of anti-tumor clonotype A were evaluated among total TCR β -chains under limiting dilution conditions either by β -chain clonotypic PCR or by TCR- β screening. Values are given in Table II. The asterisk (*) indicates that the value is based on a single positive group in the limiting dilution analysis.

We also examined the presence of the TCR β -chain of the anti-MAGE-3.A1 (clonotype 1) and the anti-MAGE-3.DP4 (clonotype 2) T cell clone in the three postvaccination metastases. To this end, the clonotypic PCR were applied on groups of larger aliquots (2×10^3 - 10^4) of TCR- β transcripts. As shown in Fig. 3B and Table II, the frequency reached 6.7×10^{-5} and 1.4×10^{-5} , respectively, indicating little or no enrichment relative to the blood. The frequencies of these β -chains provide a maximum estimate of the presence of clonotype 1 and 2, as only the β -chain mRNA was assessed. Indeed, the coexistence of T lymphocytes expressing an identical β -chain but a different α -chain cannot be excluded, especially when considering low frequencies. This also applies to the very low frequencies of the β -chains of clonotypes 1, 2, and A observed in a prevaccination metastasis. These data strongly suggest that clonotypes 1, 2, and A were not involved in an anti-tumor response before vaccination.

Discussion

Patient LB2586 with a relapsing melanoma was vaccinated with autologous monocyte-derived mature DC pulsed with two MAGE-A3 peptides presented by HLA-A1 and HLA-DP4. The patient experienced a mixed clinical response with some skin metastases regressing while others were progressing, albeit at a relatively slow rate. Progressing metastases were surgically removed. In September 2007, the patient was still alive and disease-free nearly 5 years after the start of the treatment. We analyzed the T cell response of this patient, comparing the frequencies of T cells in the blood and at the tumor sites. We observed that: 1) CTL directed against tumor Ags were already present before vaccination at frequencies $>10^{-4}$ among CD8 T cells; 2) upon vaccination, anti-MAGE-3.A1 CD8 T cells and anti-MAGE-3.DP4 CD4 T cells appeared at a low frequency, not exceeding 5×10^{-5} in the blood and showing little or no enrichment at tumor sites; and 3) the vaccination was associated with the activation of a

new anti-tumor clonotype directed against a MAGE-C2 Ag (clonotype A), and these anti-tumor T cells were enriched >1,000-fold at tumor sites relative to the blood.

Our observations strikingly resemble those presented earlier by our laboratory, analyzing the T cell response of melanoma patient EB81 who was vaccinated with a recombinant ALVAC-MAGE- 3.A1 virus and who experienced a nearly complete regression ⁽⁵⁶⁾. Similarities relate to the existence of an anti-tumor response already present before vaccination, to the weakness of the anti-vaccine response, and to the contrasting burst of an anti-tumor CTL response that is highly concentrated at tumor sites and again remarkably focused on Ags derived from *MAGE-C2*.

The fact that anti-MAGE-C2 CTL (clonotype A) was found at tumor sites that were classified as slowly progressing but not re- gressing may cast some doubt on the ability of this new wave of CTL to destroy tumor cells. However, in patient EB81 new waves of anti-tumor CTL were observed in regressing as well as progressing metastases. These observations suggest that the clinical classification of tumor lesions between progressing, stable, or regressing metastasis is a simplification that does not consider the heterogeneity within each tumor site. One could hypothesize that anti-tumor CTL recognize and eliminate tumor cells not only in regressing but also in progressing lesions, although in a lower proportion in the latter.

In the present study, patient LB2586 was first vaccinated with a class I MAGE- 3.A1 Ag. After nine vaccinations, the patient received an additional class II MAGE- 3.DP4 Ag. The T cell response against the class II epitope was of the same order of magnitude as the T cell response against the class I epitope in the blood and did not concentrate in the tumor either. There is no indication that the addition of the class II peptide influenced the course of events, as tumor regressions and the emergence of anti-MAGE-C2.B44 clonotype A were initiated before the addition of the class II peptide.

Taken together, the data related to the response of patient LB2586 support the scenario proposed after the analysis of the response of patient EB81: anti-vaccine T cells are not numerous enough to be the effectors able to destroy the tumor mass but somehow they trigger the massive production of anti-tumor T cells potentially able to proceed to tumor eradication ^(56,139). We are presently investigating whether or not this process occurred in patients who did not respond to vaccination.

The occurrence of T cell responses directed against other antigenic determinants than those targeted by a vaccine or by adoptive T cell transfer is a phenomenon commonly referred to as epitope spreading. The classical example was experimental encephalomyelitis, where priming mice with one myelin antigenic peptide produced not only T cells that reacted against this peptide but others that recognized different determinants of the same protein and other myelin Ags ⁽¹⁴⁰⁾. Epitope spreading is presumably due to the fact that the recognition of one Ag on a target cell by T cells generates conditions such as cytokine release and target cell destruction that facilitate the presentation of other Ags present on the target cells. This mechanism was probably the basis for the observation that tum⁻ variants, i.e., immunogenic variants obtained from mouse tumors, could trigger a T cell response against a tumor Ag of the original tumor even though this tumor was absolutely nonimmunogenic ⁽⁴⁰⁾. More recently, Markiewicz et al. ⁽¹⁴¹⁾ observed that the immunization of mice against epitope P1A of mastocytoma P815, followed by rejection of a P1A⁺ tumor, subsequently yielded CTL activity against epitope P1E and protection against a P1A⁻ P1E⁺ tumor variant. Lally et al. ⁽¹⁴²⁾ documented the surfacing of the immune reactivity of circulating lymphocytes toward an epitope of the *MAGE-12* gene after the vaccination of a melanoma patient with a gp100 epitope that resulted in a temporary regression of a single metastasis. Determinant spreading was suggested by Butterfield et al. to be associated with clinical

response^(143,144). In one patient vaccinated with DC pulsed with a MART-1/Melan-A epitope who showed a complete response, they observed in an ELISPOT assay an increase in the frequency of T cells directed against gp100 and tyrosinase, but this increase was <4-fold. Vignard et al.⁽¹⁴⁵⁾ observed that after the adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL new expanded clonotypes appeared, suggesting that infused CTL clones may have initiated an anti-tumor response resulting in the expansion of a Melan-A-specific repertoire.

Our data are in line with the concept of epitope spreading. But they go beyond it, as the response against the vaccine Ag remains small and triggers a burst of T cells that are directed against other tumor Ags and that accumulate at tumor sites. In this scenario, the magnitude of the T cell response against the vaccine is not the limiting factor of therapeutic anti-cancer vaccination. The limiting factors may be the ability of the anti-vaccine T cells to reach the tumor and their ability to initiate some tumor cell killing despite the immunosuppressive environment of the tumor, or the capacity of this killing to overcome the local immunosuppression and trigger a massive response against other tumor Ags.

Because of pioneering work conducted on the immunotherapy of patients with metastatic melanoma, it is clearly established that tumor sites are infiltrated by TIL⁽¹⁴⁶⁾. However, tumors progress under those circumstances, suggesting that tumor resistance downstream from T cell priming is at play. Many mechanisms may be involved, i.e., the activity of nutrient-catabolizing enzymes such as IDO or arginase, the expression of inhibitory ligands such as PD-L1, and the influence of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells⁽¹⁴⁷⁾. Understanding how, in some cases, anti-vaccine T cells are able to reverse such immunosuppressive processes so as to either restore the functionality of preexisting CTL clones or prime new clones may be the major challenge of immunotherapy.

Acknowledgments

We thank Jürgen Corthals and Jérôme Degueldre for samples and data managing, Vinh Ha Thi, Maria Panagiotakopoulos, and Magdalena Swinarska for technical assistance, and André Tonon for expertise with the FACS. We thank Nathalie Krack and Julie Klein for editorial assistance. We thank Pierre Coulie for critical reading of the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

3. Article 3: Etat de différenciation des clones CTL anti-vaccinaux et signification des marqueurs CCR7 et CD45RA

Suite à notre travail d'analyse des réponses anti-vaccinales chez plusieurs patients, nous avions à notre disposition un grand nombre de clones CTL dirigés contre le peptide antigénique MAGE-3.A1. Nous nous sommes alors intéressé au profil fonctionnel de ces lymphocytes T anti-vaccinaux amplifiés *in vitro*. De nombreuses publications avaient proposé une corrélation entre profil fonctionnel et état de différenciation des lymphocytes T. Nous avons donc décidé de caractériser les clones anti-vaccinaux en utilisant différents marqueurs de différenciation tels que CCR7 et CD45RA, puis de corréler les profils phénotypiques à la capacité des clones à proliférer ou à produire des cytokines après une stimulation antigénique, ainsi qu'à leur capacité à lyser des cellules présentant l'antigène. Tous les clones analysés avaient perdu l'expression de CCR7 et certains exprimaient fortement CD45RA. Nos observations ne nous permettant pas d'établir de corrélation entre un profil fonctionnel et un profil phénotypique, cela nous a amenés à questionner l'utilisation de CCR7 et CD45RA en tant que marqueurs de différenciation. Ayant constaté des variations cycliques de l'expression de CD45RA en fonction des contacts antigéniques, nous proposons que la réexpression de CD45RA à la surface des lymphocytes T CD8 CCR7⁻ soit le reflet d'une absence prolongée de contact antigénique plutôt qu'un signe de différenciation terminale.

**CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last
antigenic stimulation**

Javier Carrasco, Danièle Godelaine, Aline Van Pel, Thierry Boon,
and Pierre van der Bruggen

Blood. 2006;108: 2897-2905

From the Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium; and the Institute of Cellular Pathology, Cellular Genetics Unit, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

Reprints: P. van der Bruggen, Ludwig Institute for Cancer Research, 74 avenue Hippocrate, UCL 7459, B-1200 Brussels, Belgium;

e-mail: pierre.vanderbruggen@bru.licr.org

Abstract

The expression of CD45RA on CCR7⁻ human CD8⁺ memory T cells is widely considered to be a marker of terminal differentiation. We studied the time course of CD45RA and CCR7 expression on human antitumoral cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones and blood CD8⁺ T cells after antigenic stimulation. Our results indicate that CD45RA⁺CCR7⁺ CD8⁺ T cells are resting memory cells that, upon antigenic stimulation and during the next 10 days, proliferate, lose CD45RA, and transiently acquire CCR7. In the absence of further antigenic stimulation, they progressively re-express CD45RA and become CD45RA⁺CCR7⁺. We conclude that the expression of CD45RA on these cells is indicative of the time elapsed since the last antigenic stimulation rather than the incapacity to proliferate or particularly high lytic potential. This concept leads to a reinterpretation of the significance of the presence of CD45RA⁺ CD8⁺ memory cells in patients affected by viral infections or by cancer.

Introduction

The differentiation of naive T cells into memory and effector cells is marked by changes in the expression of surface molecules, such as CCR7 and CD45⁽¹⁴⁸⁾. Chemokine receptor CCR7 enables cells to migrate to lymph nodes^(75,149). Naive T cells express the long CD45RA isoform of the cell-surface tyrosine phosphatase CD45. It was first thought that the expression of CD45RO, the short CD45 isoform, marks memory and effector T cells, but reversion from the CD45RO phenotype to the CD45RA phenotype was observed^(150,151,152).

Staining blood T cells with antibodies to CD45RA and CCR7 revealed 3 subsets of CD4⁺ T cells and Lanzavecchia and Sallusto proposed a linear differentiation model based on these 2 markers.⁷ In this model, the naive T cells are CD45RA⁺CCR7⁺. Upon antigen encounter, they lose CD45RA and differentiate first into central memory (T_{CM}) cells, which are CD45RA⁻CCR7⁺. Upon further stimulation these cells differentiate into CD45RA⁻CCR7⁻ effector memory (T_{EM}) cells. It was proposed that the T_{CM} subset is composed of partially differentiated lymph node-homing cells with a high proliferation capacity and production of IL-2 but little or no effector function, in contrast to the T_{EM} cells, which migrate to inflamed tissues.^(148,153,98) Within the CD8⁺ T cells, the same 3 subsets were identified, plus an additional CD45RA⁺CCR7⁻ subset of cells (T_{EMRA}). These CD45RA⁺CCR7⁻ CD8⁺ T cells were reported to have very little or no proliferative capacity, except in the presence of homeostatic cytokines IL-7 and IL-15, to be highly sensitive to apoptosis, to secrete IFN- γ but nearly no IL-2, and to express high perforin levels^(154,99). Accordingly, the CD45RA⁺CCR7⁻ T cells were presented as the ultimate stage of differentiation of memory CD8 T cells, and were named terminally differentiated effector cells, even though other studies indicated that this subset of CD8⁺ T cells could be quite heterogeneous for the expression of granzyme B, TNF- α , IFN- γ ,

and FasL ⁽¹⁵⁵⁾. The quality of immune responses to viruses and tumors was often evaluated in the light of this terminal differentiation concept, and it was proposed that the CD45RA⁺CCR7⁻ cells are the most effective CD8⁺ T cells for the destruction of tumor cells and virus-infected cells.

The absence of proliferative capacity of the CD45RA⁺CCR7⁻ cells was challenged by reports on antiviral cytotoxic T lymphocytes (CTLs). The anti-cytomegalovirus (CMV) CTLs in the blood of a CMV healthy carrier could be identified with an A2/CMV tetramer and were found to have the CD45RA⁺CCR7⁻ phenotype. Upon stimulation with a CMV peptide, these cells proved capable of proliferating at least 20-fold after 5 days ⁽¹⁵⁶⁾. Very similar findings were made with Epstein-Barr virus (EBV). After resolution of mononucleosis, the CTLs directed against the BZLF1 protein of EBV had a CD45RA⁺CCR7⁻ phenotype. When these CD8⁺CD45RA⁺ T cells were sorted and stimulated with a BZLF1 peptide, the anti-BZLF1 CTLs detected 7 days later by tetramer had also proliferated considerably ⁽¹⁵⁷⁾. Moreover, both the anti-CMV and the anti-EBV CD45RA⁺ cells were found to revert to a CD45RA⁻ phenotype following antigenic stimulation.

CCR7 was proposed as a marker that is irreversibly lost by the noneffector T_{CM} cells differentiating into effector T_{EM} cells ⁽¹⁵⁸⁾. However, when blood cells from a human immunodeficiency virus (HIV)-infected subject that contain CCR7⁻ anti-gag CTLs were stimulated with a gag peptide, a large fraction of the anti-gag CTLs re-expressed CCR7 ⁽⁹⁹⁾. The same observation was made for anti-CMV CTLs ⁽¹⁵⁹⁾. When CD8⁺ CD45RA⁻CCR7⁻ blood cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, the re-expression of CCR7 was shown to be transient and to last up to 7 days ⁽¹⁶⁰⁾.

These observations have not led to a coherent view of the significance of the CD45RA and CCR7 expression on memory and effector CD8⁺ T cells, in the presence and in the absence of antigenic stimulation. We considered that the analysis of CTL clones might facilitate our understanding of the appearance and disappearance of the differentiation markers under these circumstances. We examined this issue with a set of CTL clones directed against a tumor-specific antigen encoded by gene *MAGE-3*.

Materials and methods

Anti-MAGE-3.A1 CTL clones

CTL clones were derived from anti-MAGE-3.A1 CTL precursors present in the blood of 3 different patients vaccinated with autologous mature dendritic cells pulsed with the peptide MAGE-3168-176 EVDPIGHLY presented by HLA-A1 molecules ^(127,49). The CTL clones were stimulated with irradiated (100 gray) HLA-A1⁺ MAGE-3⁺ MZ2-MEL.43 tumor cells pulsed for 1 hour with the MAGE-3 peptide (20 μM). Usually, CTL clones were cultured with the tumor cells at a 1:1 ratio in Iscove medium supplemented with 0.55 mM L-arginine, 0.24 mM L-asparagine, 1.5 mM L-glutamine, 50 μM β-mercaptoethanol (AAGβ), and 10% human serum. IL-2 (Chiron, Amsterdam, the Netherlands) was at 50 U/mL, and IL-7 and IL-15 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) were at 10 ng/mL. For some experiments, irradiated HLA-A1 allogeneic Epstein-Barr virus-infected B (EBV-B) cells or irradiated HLA-A1 allogeneic mature dendritic cells, pulsed (or not) with the MAGE-3 peptide (20 μM), were used as stimulating cells. Dendritic cells were obtained from monocytes, matured as described earlier ⁽¹⁶¹⁾, and pulsed with the MAGE-3 peptide if required. When indicated, nonpulsed irradiated allogeneic EBV-B cells were added as feeder cells. For nonspecific TCR stimulation, CTLs were cultured with anti-CD3/CD28-coated beads (Dynal, Oslo, Norway) at a 1:3 ratio. If CTL cultures were maintained for more than 15 days without stimulation, half

of the medium was replaced every 2 weeks with fresh medium and cytokines. The data shown in Figure 2C were obtained with clone DIPE6/8, an HLA-A2– restricted CD8⁺ CTL clone directed at an EBV-derived peptide, GLCTL-VAML, encoded by gene *BMLF1*. This clone was obtained by limiting dilution from a population of cells stained with an A2/BMLF1 multimer.

Antibodies

Allophycocyanin (APC)–conjugated anti–human CD8 antibody (RPA-T8; BD Pharmingen, San Diego, CA), fluorescein (FITC)–conjugated anti–human CCR7 antibody (150503; R&D Systems, Abingdon, United Kingdom), phycoerythrin (PE)–conjugated anti–human CD45RA antibody (HI100; BD Pharmingen), and PE- or FITC-conjugated anti–human CD25 antibody (M-A251; BD Pharmingen) were used for T-cell phenotype characterization. The CTLs shown in Figure 6 were labeled with a nonlabeled anti–human CCR7 antibody (150503; R&D Systems), a biotin-conjugated rat anti–mouse IgG2a antibody (R19-15, BD Pharmingen), and a phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5)–conjugated streptavidin. The samples were analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur using CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Evaluation of the expansion

Considering that many CTLs died within 2 days after TCR stimulation, the expansion of the clones was estimated in a flow cytometer by counting CD8⁺ cells in the cocultures at day 2 and day 5. Samples of the cocultures were labeled with APC-conjugated anti–human CD8 antibody; fluorescent beads (Fluoresbrite Plain YG 6 µm; Polysciences, Warrington, PA) were added in the sample at a known concentration in order to normalize the volume. The number of living CD8⁺ cells and the number of fluorescent beads acquired during the analysis were used to calculate the number of CD8⁺ cells in the coculture.

Lysis assay by flow cytometry

CTLs (20 000) were cocultured with 20 000 HLA-A1 EBV-B cells pulsed with MAGE-3 peptide (20 μ M) in 200 μ L medium. Three hours later, 70 μ L of the cocultures was labeled with APC-conjugated anti-human CD8 antibody as a marker of the effector cells, peridinin chlorophyll protein-conjugated anti-human CD19 antibody (SJ25C1; BD Pharmingen) as a marker of the target cells, and propidium iodide as vital dye. Fluorescent beads were added to the coculture samples at a known concentration in order to normalize the volume. The number of living CD19⁺ target cells was evaluated by flow cytometry in the control sample containing only the targets and in duplicate cocultures.

Cytokine production

CTLs (20 000) were cocultured with 20 000 HLA-A1 EBV-B cells pulsed with MAGE-3 peptide at 20 μ M in 200 μ L Iscove medium supplemented with 1% human serum. Eighteen hours later, cytokine release was measured in the supernatant with the Cytometric Bead Array kit (CBA, Th1/Th2; BD Pharmingen).

Quantitative PCR

After stimulation of CTL clone BAGM9, samples were collected from the coculture at different time points. Total RNA was extracted with the PURESRIPT Kit (Gentra, Minneapolis, MN) and converted to cDNA with M-murine leukemia virus reverse transcriptase using an OligodT (Life Technologies, Merelbeke, Belgium). Numbers of CCR7, CD45RA, and CD8⁺ transcripts were evaluated by quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) on an ICycler (Bio-Rad, Foster City, CA). For each gene, a standard curve was constructed as follows: a reference sample with a known number of cDNA copies of the relevant gene was diluted (10 $\times$, from 3×10^5 copies to 0.3 copy).

The threshold cycles were determined for each dilution and used to build a standard curve. Threshold cycles were then calculated for each sample and were reported on the standard curve to estimate the absolute number of transcripts. The results for CCR7 and CD45RA were normalized to the number of CD8 β transcripts. They were expressed in number of mRNA copies per CTL, on the basis of one CTL containing 40 CD8 β transcripts. This estimate of 40 CD8 β mRNA per cell was based on observations with peripheral-blood mononuclear-cell (PBMC) and CD8 CTL clones ⁽⁵⁶⁾ (and B. Lethe', Ludwig Institute for Cancer Research [Brussels, Belgium], oral communication, 2006). For CD8 β q-PCR, the upstream primer was 5'CTTCTGCATGATCGTCGGGA3' (Eurogentec, Liège, Belgium), the downstream primer was 5'GGCCCTTCTGGGTCTCTG3', and the probe was 5'6-FAM-CCCACCACTGCCCAGCCCAC-TAMRA3' (Eurogentec). Annealing temperature was 60°C. For CCR7 q-PCR, the upstream primer was 5'CGTGCTGGTGGTGGCTCT3', the downstream primer was 5'TGCCCAGTAGGCCACGAA3', and the Taqman probe was 5'6-FAM-CATCGGAGACAACACCACAGTGGACTA-TAMRA3'. Annealing temperature was 60°C. For CD45RA q-PCR, upstream primer was 5'ACAGCAAAGATGCCCAGT3' and matched with exon 4 that is spliced in the CD45RO isoform. The downstream primer was 5'TGTGGTTGAAATGACAGCG3' and matched with exon 7. The probe was 5'6-FAM-ACCTACTCACCACTGCATTCT-Darquencher3' matching with exon 4. Annealing temperature was 57°C.

Ex vivo analysis of CD8⁺ blood cells

Peripheral-blood mononuclear cells were isolated from standard buffy coat preparations obtained from hemochromatosis donors by Lymphoprep (Axix-Shiel PoCAS, Oslo, Norway). CD8⁺ T cells were then isolated by positive selection with anti-CD8-coated

magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The purity of the magnetic selection was up to 97%. Selected CD8⁺ cells were labeled with an FITC-conjugated anti-CCR7 antibody and a PE-Cy5-conjugated anti-CD45RA antibody. Sorted cells were labeled with the PE-fluorescent dye PKh26 (Sigma, St Louis, MO) at 2 μ M. About 3×10^5 cells were stimulated with 5×10^5 anti-CD3/anti-CD28-coated beads (Dyna) in 2 mL Iscove medium supplemented with AAG β , 1% of heat inactivated autologous human serum, and IL-2 (2 U/mL).

Results

Lack of relation between CD45RA expression and functional phenotype of CTL clones

Melanoma patients have been vaccinated with autologous mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptide EVDPIGHLY, which is presented by HLA-A1 molecules ⁽⁴⁹⁾. We examined a series of anti-MAGE-3.A1 CTL clones that had been obtained from independent microcultures of blood cells after 3 to 5 antigenic stimulations performed at approximately 2-week intervals ⁽¹²⁷⁾. The clones were selected on the basis of their ability to be stained with HLA-A1/ MAGE-3 complexes, hereafter referred to as A1/MAGE-3 tetramer. They were also selected for their ability to lyse both HLA-A1 cells pulsed with the peptide and HLA-A1 tumor cells expressing MAGE-3.

We set out to analyze CTL clones for CD45RA and CCR7 expression to examine how they related to the subgroups defined by the linear differentiation model on blood CD8 T cells ^(98,99). The anti-MAGE-3.A1 CTL clones that were analyzed had been stimulated with their antigen 2 to 7 weeks before. All had a CCR7⁻ phenotype (Figure 1A). In contrast, their CD45RA surface expression was variable with a mean fluorescence intensity (MFI) spread over a 20-fold range. On some clones, the CD45RA surface expression was as low as on the CD45RA⁻CCR7⁻ subset of CD8⁺ PBMCs, and on others

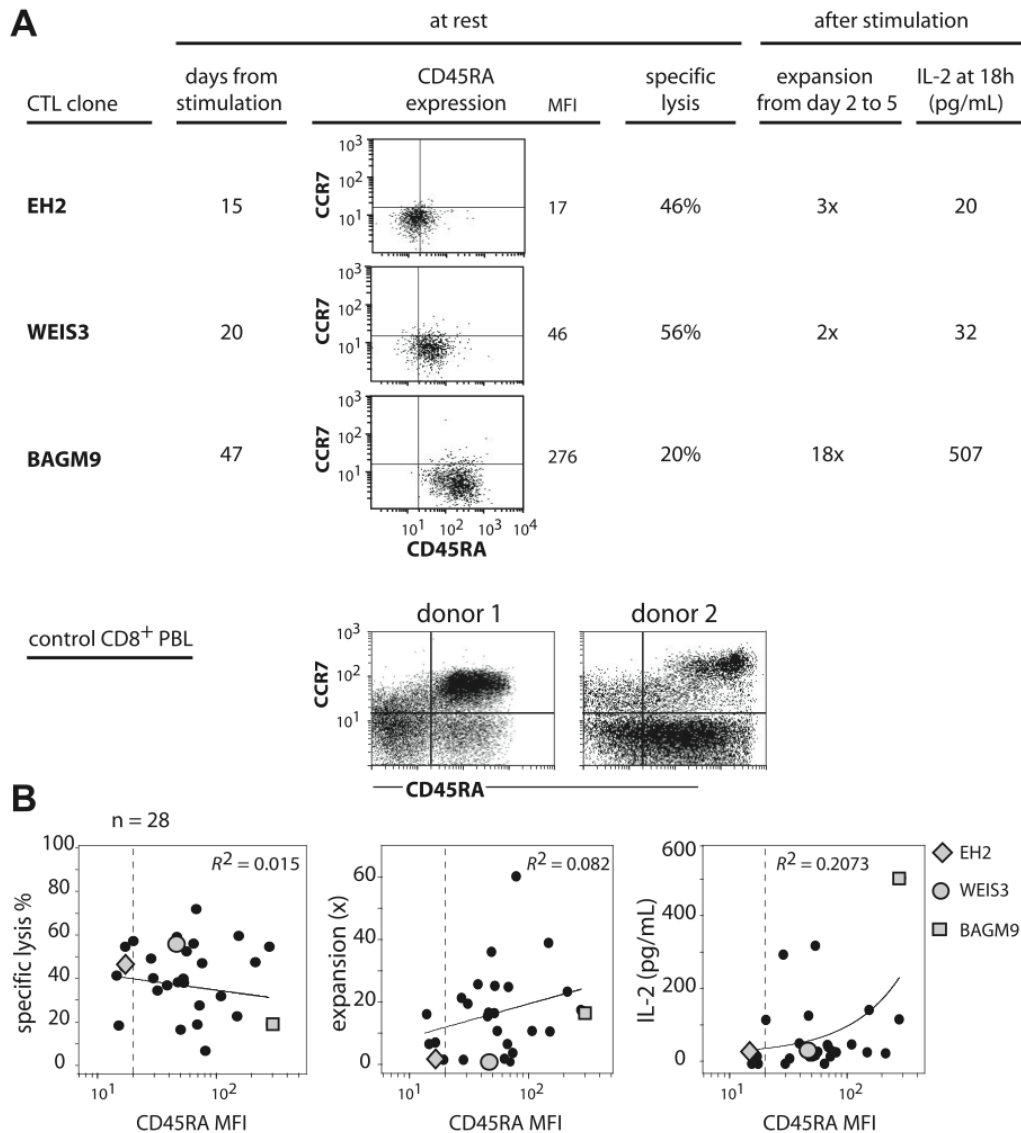


Figure 1. CD45RA/CCR7 phenotype and functional properties of anti-MAGE-3.A1 CTL clones. (A) The CTL clones from cancer patients were labeled in the same conditions as the CD8⁺ PBLs from donors. Cells were labeled for 15 minutes at room temperature with an FITC-conjugated anti-CCR7 antibody, a PE-conjugated anti-CD45RA antibody, and an APC-conjugated anti-CD8 antibody. Only the living CD8⁺ PBMCs are shown. Quadrant limits were positioned so as to include in the lower left quadrant 99% of the cells labeled with a control isotype-matched antibody. Lysis was tested by flow cytometry with CTL clones that had been stimulated 15 to 47 days before. The targets were EBV-B cells pulsed with the MAGE-3 peptide. Target cells were mixed with the CTL at an effector-target ratio of 3 and the number of living CD19⁺ target cells was estimated after a 3-hour coculture. Expansion and IL-2 release were estimated after antigenic stimulation. Twenty thousand CTLs were cocultured with 20 000 HLA-A1 EBV-B cells pulsed with the MAGE-3 peptide. Considering that up to 75% of the CTLs died within 2 days, the expansion of the clones was evaluated in a flow cytometer by counting the number of CD8⁺ cells at day 2 and at day 5. The presence of IL-2 was evaluated in the supernatant of the coculture using cytometric bead arrays. (B) A total of 28 anti-MAGE-3.A1 CTL clones was tested in the conditions described in panel A. Ninety-nine percent of the cells labeled with the control isotype-matched antibody had a fluorescence lower than the limit indicated by the dashed line. The best correlation curve and the coefficient of determination (R²) are indicated.

it was as high as the CD45RA⁺CCR7⁻ subset, as shown in Figure 1A for 3 representative CTL clones. The clones were evaluated for their lytic activity on specific targets. Their ability to proliferate and to produce IL-2 upon antigenic stimulation was also evaluated. Contrary to common assertions regarding the terminally differentiated state of CD45RA⁺CCR7⁻ CD8⁺ T cells, we found no positive or negative correlation between CD45RA expression and proliferation potential. As seen in Figure 1A, CD45RA^{high} clone BAGM9 proliferated much better upon antigenic stimulation and produced much more IL-2 than CD45RA^{low} clone EH2. In addition, clone BAGM9 had a lower lytic activity than clone EH2. The analysis of 28 CTL clones did not reveal any correlation between on the one hand their expression of CD45RA and on the other hand their lytic activity at rest and their proliferation and production of IL-2 upon restimulation (Figure 1B).

Time course of CD45RA expression after stimulation

We observed that a higher expression of CD45RA was usually found on those clones that had been left without antigenic stimulation for a long time. This suggested that CD45RA expression might increase with the time elapsed in the absence of antigenic stimulation. We therefore evaluated CD45RA expression at various times after stimulation.

CD45RA^{high} CTL clone BAGM9, which had not been in contact with antigen for 47 days, was stimulated with tumor cells pulsed with peptide in the presence of IL-2. At various times after stimulation, the surface expression of CD45RA was measured by flow cytometry. A homogeneous decrease in surface expression by approximately 14-fold was observed on day 2 after stimulation. As a result, 60% of the cells had a fluorescence lower than the upper 1% of the isotype control, defining them as CD45RA⁻ (Figure 2A). Surface expression remained very low until day 15. We also evaluated by

quantitative PCR the amount of the CD45RA final transcript, which results from a splicing that differs from that of CD45RO. The number of CD45RA transcripts also decreased, being 5-fold lower on day 2 and 10-fold lower on day 15 (Figure 2A). It is noteworthy that surface expression dropped more rapidly than the number of transcripts, possibly because of endocytic removal of CD45RA after antigenic stimulation.

After day 15, both the transcripts and the surface expression of CD45RA increased gradually. By day 84, they had regained their initial level. All the CD45RA⁺ CTL clones that were tested showed CD45RA decrease after antigenic stimulation, but the

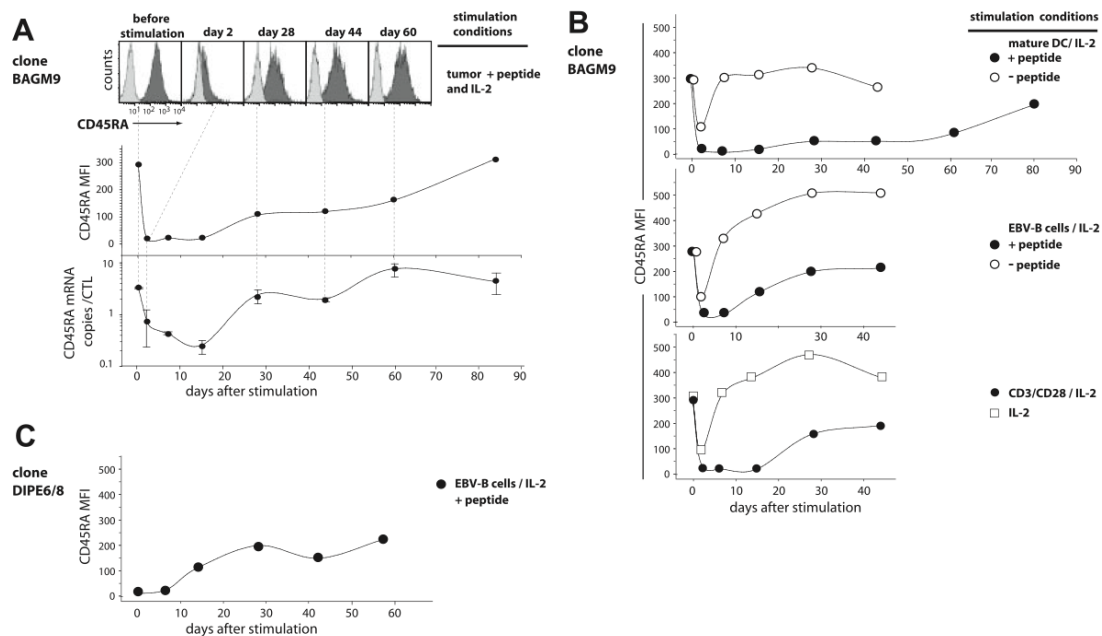


Figure 2. Time course of CD45RA expression on antigen-stimulated CTLs. (A) BAGM9 CTLs (2×10^5), which had a CD27⁺CD28⁺ phenotype, were stimulated with 2×10^5 MZ2-MEL.43 tumor cells pulsed with the MAGE-3 peptide, in the presence of IL-2. Half of the medium was replaced at 2-week intervals by fresh medium and IL-2. Samples were collected from the coculture at different time points. Cells were labeled with an APC-conjugated anti-CD8 antibody and either a PE-conjugated anti-CD45RA antibody (black histograms) or a control isotype-matched antibody (gray histograms). Only the living CD8⁺ cells are shown in the figure. Surface expression of CD45RA is indicated as the MFI after subtraction of the MFI of the cells labeled with the control isotype-matched antibody. The number of CD45RA transcripts was evaluated by quantitative PCR, and the results were normalized to the CD8 transcripts. (B) Clone BAGM9 was stimulated with beads coated either with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, mature dendritic cells, or EBV-B cells. When indicated, cells were pulsed with the MAGE-3 peptide. Samples were collected from the cocultures at different time points and the surface expression of CD45RA was evaluated as described in panel A. (C) DIPE6/8 CTLs (3×10^5) were stimulated with 1.5×10^5 HLA-A2 EBV-B cells pulsed with the BMLF1 peptide, in the presence of IL-2. Cells were cultured, sampled, and analyzed in the same conditions as in panels A-B.

importance of the decrease and the kinetics of the re-expression were variable from one clone to another. As expected, the transcription and surface expression of CD45RO isoform varied inversely relative to CD45RA (data not shown).

The contact of CTLs with mature dendritic cells pulsed with the peptide produced a longer period of low CD45RA surface expression than pulsed EBV-B cells, tumor cells, or anti-CD3/CD28 antibodies, consistent with the idea that they induce optimal stimulation of T cells (Figure 2B). Adding to CTL BAGM9 dendritic cells or EBV-B cells in the absence of the antigen, adding cytokines only, or simply mixing the CTLs generated a short-lived 3-fold decrease of CD45RA surface expression (Figure 2B). But we did not observe this decrease with another CTL clone.

In addition to MAGE-3-specific CTLs, we also tested HLA-A2-restricted CTL clone DIPE6/8 directed against an EBV antigen encoded by gene *BMLF1*. On the day on which this CTL was stimulated with peptide-pulsed cells, it was already CD45RA⁻ because of a recent stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies (Figure 2C). Ten days after stimulation with the antigenic peptide, the expression of CD45RA gradually increased and reached after one month a plateau level of CD45RA that was comparable with that observed with the anti-MAGE-3 CTL clone.

Time course of CCR7 expression on CTL clones after antigenic stimulation

Several groups have reported that CD45RA⁻CCR7⁻ CD4⁺ and CD8⁺ blood T cells express CCR7 after TCR stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (148,156,159). We examined this process in CTL clones that had not been stimulated for at least 14 days.

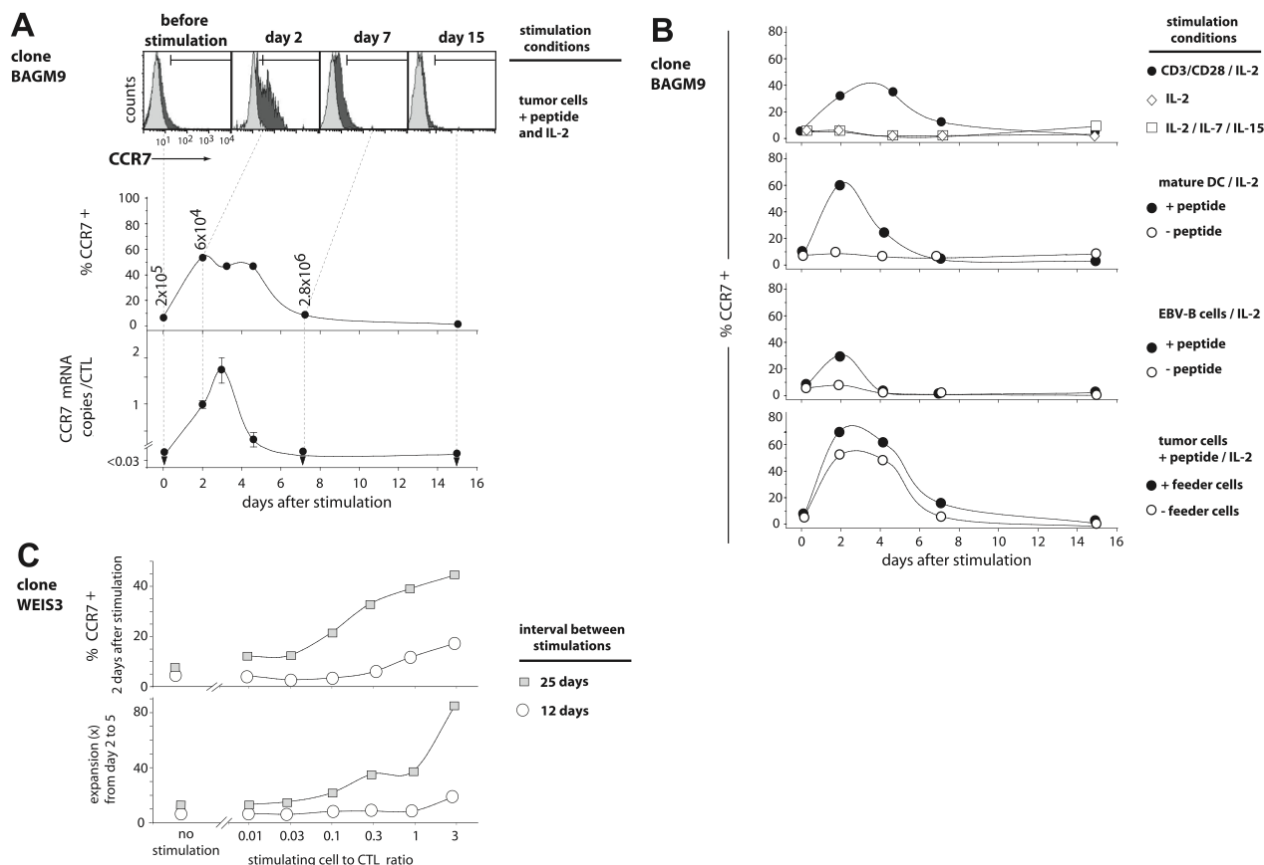


Figure 3. Time course of CCR7 expression on antigen-stimulated CTLs. (A) BAGM9 CTLs (2×10^5) were stimulated with 2×10^5 MZ2-MEL.43 tumor cells pulsed with the MAGE-3 peptide in medium containing IL-2 (50 U/mL). Half of the medium was replaced at 2-week intervals by fresh medium and IL-2. Samples were collected from the coculture at different time points. Cells were labeled with an APC-conjugated anti-CD8 antibody and either an FITC-conjugated anti-CCR7 antibody (black histograms) or a control isotype-matched antibody (gray histograms). Only the living CD8⁺ cells are shown. Surface expression of CCR7 is indicated as the percentage of the cells having a fluorescence intensity above 99% of the cells labeled with the control isotype-matched antibody. The total amount of living CTLs before stimulation and at day 2 and 7 is indicated. The number of CCR7 transcripts was evaluated by quantitative PCR, and the results were normalized to the CD8 transcripts. (B) Clone BAGM9 was stimulated with either beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, mature dendritic cells, or EBV-B cells. If indicated, cells were pulsed with the MAGE-3 peptide. Samples were collected from the cocultures at different time points and the CCR7 surface expression was evaluated. (C) CTL clone WEIS3 had a CD27⁺CD28⁺ phenotype. Some CTLs were stimulated with their antigen 25 days before and some others 12 days before. CTLs (10^5) were stimulated with MZ2-MEL.43 tumor cells pulsed with the MAGE-3 peptide at the indicated stimulating-cell/CTL ratio. The surface expression of CCR7 was measured 2 days after stimulation. Cells were labeled with an FITC-conjugated anti-CCR7 antibody. The percentage of the cells having a fluorescence intensity above 99% of the cells labeled with the control isotype-matched antibody is indicated on the y-axis. The expansion of the clones was evaluated in a flow cytometer by counting the number of CD8⁺ cells at day 2 and at day 5.

Clone BAGM9 was stimulated with tumor cells pulsed with peptide. Two days after antigenic stimulation, 52% of the cells showed a significant CCR7 surface expression (Figure 3A). It remained high until day 5 and returned to basal level by day 7. The CCR7 transcripts, which were undetectable at rest, also increased rapidly after stimulation. The number of CCR7 mRNAs reached a maximum at day 3 and then decreased rapidly to become undetectable at day 7.

A similar cyclic variation of the CCR7 expression after antigenic stimulation was observed for all 28 analyzed CTL clones, but the percentage of cells that switched on CCR7 varied from one clone to another, ranging from 5% to 58% of the cells (Figure 4). Invariably, CCR7 surface expression disappeared within 2 weeks.

TCR stimulation, provided either by the antigen or by CD3/ CD28 ligation, was strictly required for the up-regulation of CCR7 (Figure 3B). IL-2 alone did not trigger expression of CCR7. This also applied to the combination of IL-2, IL-7, and IL-15, which is known to be sufficient for the induction of proliferation and production of IFN- γ , TNF- β , perforin, and granzyme B ⁽¹⁶²⁾. The highest percentages of cells switching on CCR7 were obtained after stimulation with peptide-pulsed mature dendritic cells or peptide-pulsed tumor cells together with EBV-B feeder cells. A longer resting period before stimulation resulted in a higher percentage of cells switching on CCR7, and in a more intense proliferation (Figure 3C). The percentage was also higher when the number of presenting cells per CTL was higher (Figure 3C). Among all the stimulation conditions that were tested, none induced a CCR7 expression on all the cells, even though activation marker CD25 was up-regulated in more than 99% of the CTLs (data not shown).

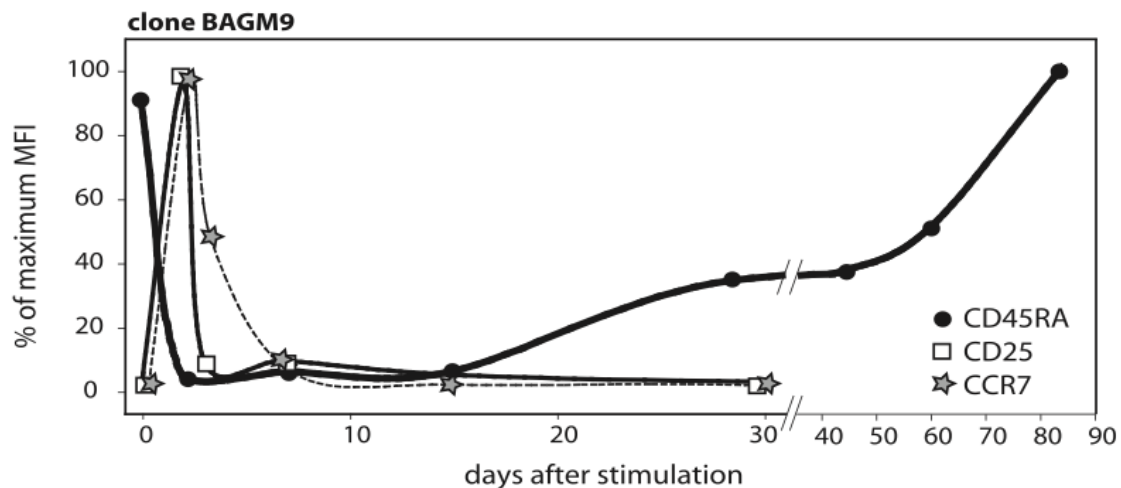


Figure 4. Time course of CD45RA, CCR7, and CD25 surface expression after antigenic stimulation. The surface expressions of CD45RA and CCR7 were already shown in Figures 2A and 3A. CD25 surface expression was evaluated on samples collected from the cocultures at different time points. Cells were labeled with an APC-conjugated anti-CD8 antibody and either a PE-conjugated anti-CD25 antibody or a control isotype-matched antibody. Surface expression of these 3 markers is indicated as a percentage of the highest MFI, which was 318 for CD45RA, 28 for CCR7, and 789 for CD25.

Upon stimulation, CD25 and CCR7 reappeared very rapidly, reaching a maximum around day 2 (Figure 4). CD25 disappeared by day 3 and CCR7 by day 7. We would like to call activated T cells those T cells that have been stimulated by their antigen fewer than 10 ± 3 days before, as during that period they proliferate significantly, and they transiently express CD25 and CCR7. The gradual process of re-expression of CD45RA begins after the disappearance of CD25 and CCR7, provided that T cells do not receive further antigenic stimulation (Figure 4).

We observed a correlation between the percentage of cells that switched on CCR7 and the degree of clone expansion following antigenic stimulation, suggesting that cells that up-regulated CCR7 multiplied more (Figure 5). In contrast, the production of TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, or IL-2 upon stimulation was not correlated with CCR7 expression (data not shown).

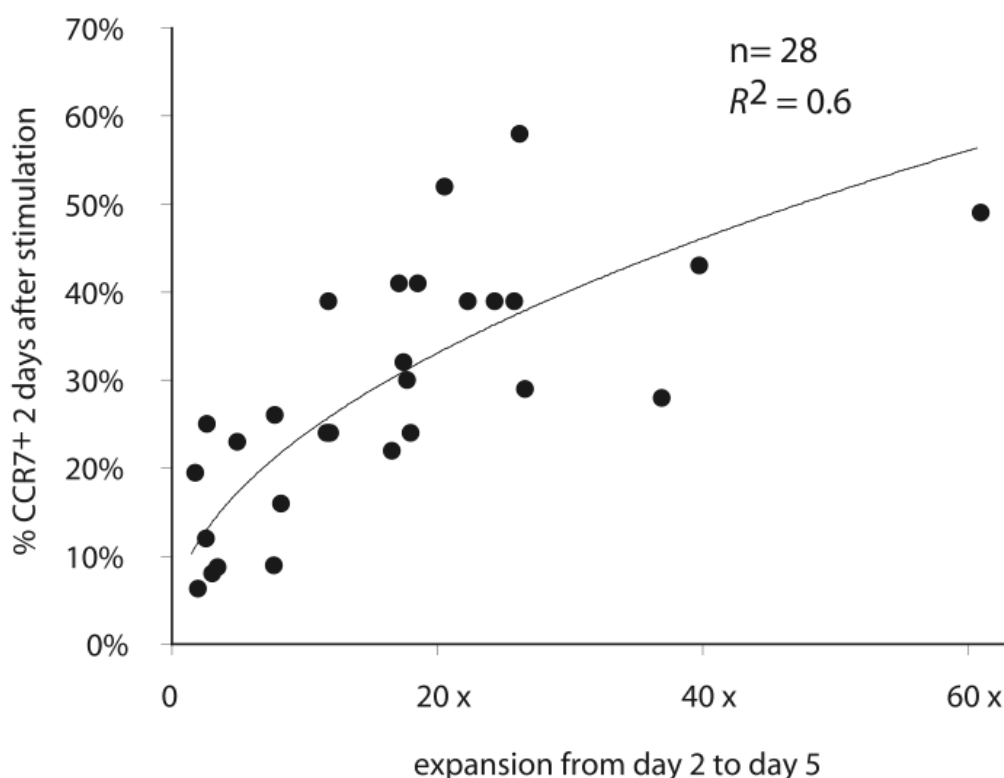


Figure 5. Correlation between the percentage of CCR7⁺ cells after stimulation and clone expansion. The 28 anti-MAGE-3.A1 clones were stimulated with MZ2-MEL.43 tumor cells pulsed with the MAGE-3 peptide and IL-2. Samples were collected 48 hours after stimulation. Cells were labeled with an APC-conjugated anti-CD8 antibody and either an FITC-conjugated anti-CCR7 antibody or a control isotype-matched antibody. Surface expression of CCR7 is expressed as the percentage of the cells having a fluorescence intensity above 99% of the cells labeled with the control isotype-matched antibody. Expansion was estimated by counting the number of CD8⁺ cells at days 2 and 5 by flow cytometry. The best correlation curve and the coefficient of determination (R^2) are indicated

We examined whether the subset of T cells that up-regulated CCR7 following one stimulation had a higher tendency than the others to up-regulate CCR7 following subsequent stimulations. To this end, we tried to separate the CCR7^{high} and the CCR7^{low} subsets observed following stimulation of CTL clone WEIS3. After 40 hours, 83% of the cells expressed CCR7 (Figure 6). The CCR7^{high} and CCR7^{neg} subsets were selected in a flow cytometer. Two weeks later, both subpopulations were stimulated again. Both sets produced CCR7⁺ and CCR7⁻ cells in proportions that were similar to those observed after the first stimulation. However, upon an additional sorting of the CCR7^{high} and CCR7^{neg} subsets, followed by a stimulation 2 weeks later, the CCR7^{high} subset

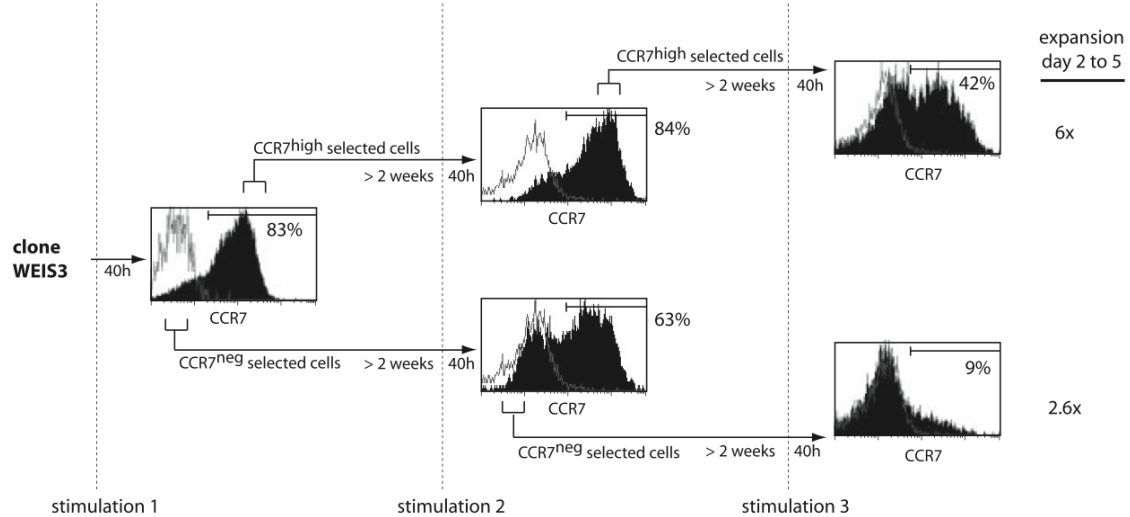


Figure 6. Selection of a subpopulation having lost the ability to switch on CCR7 upon stimulation. CTL clone WEIS3, which had a CD27⁻CD28⁻ phenotype, was stimulated with MZ2-MEL.43 tumor cells pulsed with the MAGE-3 peptide and IL-2. Cells were stained 40 hours after each stimulation with an anti-CCR7 antibody, with a biotinylated anti-mouse IgG2a antibody, and with a PE-Cy5-conjugated streptavidin (black histograms). Control cells were stained with an isotype-matched antibody instead of the anti-CCR7 antibody (empty histograms). Cells with the highest fluorescence (CCR7^{high}) and cells with the lowest fluorescence (CCR7^{neg}) were selected by flow cytometry, cultured with IL-2, and restimulated approximately 2 weeks later. The percentages indicated in the figure correspond to the fraction of the cells having a fluorescence intensity above 99% of the cells labeled with the control isotype-matched antibody. After 2 rounds of selection and a further stimulation, 60% of the cells were surviving at day 2 for both subpopulations. Expansion was estimated at days 2 and 5 after stimulation by counting the CD8⁺ cells by flow cytometry.

produced 42% of CCR7⁺ cells, whereas the CCR7^{neg} subset produced only 9% CCR7⁺ cells (Figure 6). The CCR7^{high} and the CCR7^{neg} selected subsets showed expansion of 6-fold and 2.6-fold, respectively, in line with the observations described in Figure 4. The same result was obtained in 3 independent experiments, suggesting that it may be possible to select T cells that have lastingly lost their potential to up-regulate CCR7. Our observation of a higher proliferation of the cells that up-regulated CCR7 is in accordance with observations made with polyclonal blood cells ⁽¹⁶⁰⁾. We observed no difference between the 2 subsets in terms of surface markers CD27 and CD28, which were both negative.

Ex vivo analysis of CD8⁺ blood cells

In the experiment reported by Champagne et al ⁽⁹⁹⁾, unfractionated blood cells labeled with cell-division marker CFSE were stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies. Taking samples after time intervals ranging from 36 to 60 hours, they observed no dilution of CFSE among the CD8⁺ cells that were CD45RA⁺ and CCR7⁻ at that time. They concluded that CD45RA⁺CCR7⁻ cells had no proliferation potential in keeping with the notion of terminally differentiated T cells.

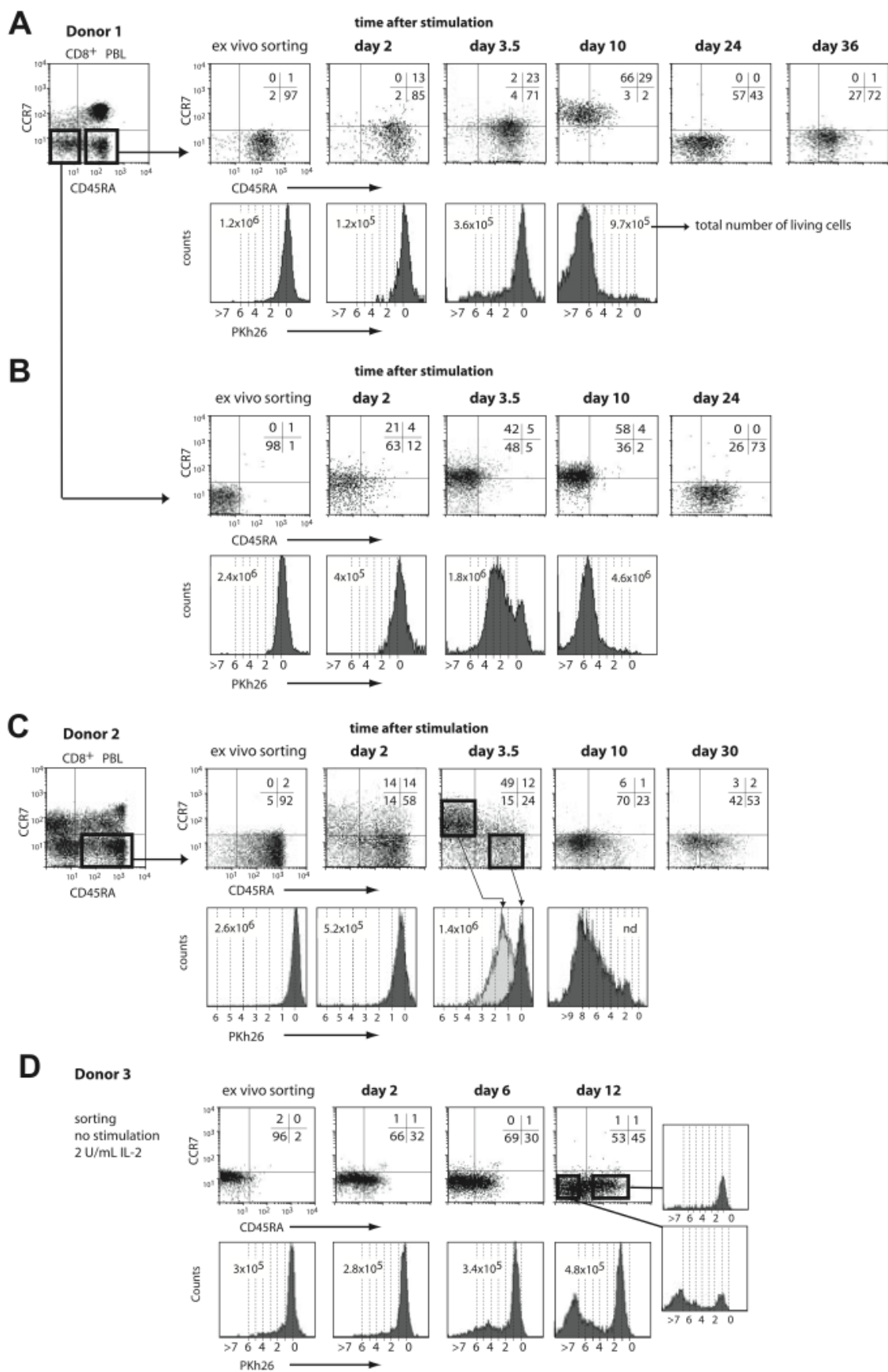
To re-examine the proliferation potential of CD45RA⁺CCR7⁻ CD8⁺ T cells, we designed our experiment differently. After selecting CD8⁺ blood cells by magnetic sorting, CD45RA⁺CCR7⁻ cells were sorted by flow cytometry and they were labeled with the PKh26 dye to follow cell division. The cells were then stimulated with beads coated with anti-CD3/CD28 antibodies. The cells were examined at various times thereafter to assess CCR7 and CD45RA surface expression and Pkh26 dilution. We tested blood from various donors and we observed the same evolutions in all the experiments, but the time courses varied considerably. In the first experiment shown in Figure 7A, by day 3.5 most of the cells had remained CD45RA⁺CCR7⁻ and had not divided. But by day 10, all the cells had become CCR7⁺ and most had lost CD45RA. Most of these cells had undergone from 5 to more than 7 divisions. By day 24, all the cells had lost CCR7 and the proportion of CD45RA⁺ cells had increased. By day 36, most of the cells were again CD45RA⁺CCR7⁻. An experiment with CD45RA⁺CCR7⁻ cells from another donor is shown in Figure 7C. Here the evolution showed a faster time course. At day 2, 28% of the cells were CCR7⁺, half of those being also CD45RA⁻. At day 3.5, 50% of the cells were in a CD45RA⁻CCR7⁺ cluster and had undergone 1 to 3 divisions. In contrast, the 24% of the cells that had remained CD45RA⁺CCR7⁻ had not divided at all. By day 10, all the cells were again CCR7⁻, most being CD45RA⁻. Most of

the cells had divided 4 to 9 times. By day 30, half the cells were CD45RA⁺CCR7⁻. These results indicate clearly that the CD45RA⁺CCR7⁻ compartment contains many cells that have a considerable proliferative capacity upon stimulation. Champagne et al did not observe this proliferation because their experimental design precluded observation of the CD45RA⁺CCR7⁻ cells that became CD45RA⁻ or CCR7⁺ following stimulation⁽⁹⁹⁾.

In addition to the CD45RA⁺CCR7⁻ cells, we also sorted CD45RA⁻CCR7⁻ cells from the blood CD8⁺ T cells of donor 1 (Figure 7B). The cells were also labeled with the PKh26 dye and were stimulated with beads coated with anti-CD3/CD28 antibodies. By day 3.5, half of the cells had acquired CCR7 and a majority had made between 1 and 4 divisions. By day 24, all the cells had lost CCR7 and 73% had acquired CD45RA expression. We conclude that a long period without antigenic stimulation results in the re-expression of CD45RA on most CD45RA⁻CCR7⁻ CD8⁺ T cells.

To analyze the evolution of CD45RA⁻CCR7⁻ cells in the absence of stimulation, such cells were sorted from the blood CD8⁺ T cells of another donor (Figure 7D). The cells were labeled with the PKh26 dye and kept in culture with only 2 U/mL IL-2, but were not stimulated with antibody-coated beads. By day 12, 45% of the cells had become CD45RA⁺. These cells had made only one division. Fifty-three percent of the cells had remained CD45RA⁻. The majority of these cells had made more than 5

Figure 7. CD45RA and CCR7 expression and proliferation of different CD8⁺ blood-cell subsets upon stimulation. Blood CD8⁺ cells were positively selected by magnetic sorting and labeled with an FITC-conjugated anti-CCR7 antibody and a PE-Cy5-conjugated anti-CD45RA antibody. The CD45RA⁺CCR7⁻ and CD45RA⁻CCR7⁻ subsets were sorted by flow cytometry, labeled with PKh26, and distributed at approximately 3×10⁵ cells per well. Cells were either stimulated with beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of 2 U/mL IL-2 (A-C) or kept in culture with 2 U/mL IL-2 (D). Samples were collected at different time points after stimulation, and CD45RA/ CCR7 surface expression was evaluated with the antibodies used for the sorting. Quadrant limits were positioned so as to include in the lower left quadrant 99% of the nonlabeled cells, and the numbers correspond to the percentage of cells in each quadrant. Proliferation was measured by the dilution of the Pkh26 dye and the dashed lines correspond to the number of divisions.



divisions, suggesting that they may be derived from a small subset of the original population. Considering that 8% of the CD45RA⁺CCR7⁻ cells from donor 3 expressed CD25 (Table I), suggesting a recent activation event, it is possible that these cells could account for the proliferating cells that had remained CD45RA⁺ at day 12.

Returning to the observations that upon stimulation most cells of the CD45RA⁺CCR7⁻ subset became CCR7⁺ and proliferated (Figure 7A,C), one could have argued that the CD45RA⁺ cells die, whereas a small contamination of CD45RA⁻ cells proliferate heavily to produce the CCR7⁺ cells. These CD45RA⁻ cells could have contributed many of the 10% to 20% of the cells that were alive 2 days after stimulation. However, the percentage of surviving cells was similar in the experiments performed with the CD45RA⁺CCR7⁻ cells of patient 1 and their degree of proliferation was also similar (Figure 7B). We therefore conclude that most of the cells of the CD45RA⁺CCR7⁻ subset that became CCR7⁺ and proliferated were indeed CD45RA⁺CCR7⁻ cells. A low proportion of surviving cells was also observed on day 2 after stimulation with the CTL clones. Only 30% of the BAGM9 CTLs survived after stimulation with peptide-pulsed tumor cells (Figure 3), and only 13% after stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies (data not shown).

If the CD45RA⁺CCR7⁻ blood CD8⁺ T cells are cells that have not seen their antigen for several weeks, this subset of cells should not contain recently activated T cells. To estimate the proportion of activated T cells, we sorted blood CD8⁺ T cells of various donors by magnetic sorting and immediately labeled them with antibodies against activation marker CD25 (Table I). For all the donors, the lowest percentage of CD25⁺ cells, 1% or less, was observed in the CD45RA⁺CCR7⁻ subset. The CD45RA⁻CCR7⁺ compartment contained the highest proportion of CD25⁺ cells, as expected if most activated T cells express CCR7 and if for primary blood cells the peak of CD25

expression is shorter than the CCR7 peak, as observed for CTL clones (Figure 5). The presence of some CD25⁺ cells among the CD45RA⁺CCR7⁺ cells could reflect the fact that upon activation only a fraction of the T cells re-express CCR7, as observed with the CTL clones.

	CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	CD45RA ⁺ CCR7 ⁺
Donor 1 (3%)	1	6	3	1
Donor 2 (2%)	1	6	3	1
Donor 3 (3%)	1	14	8	1
Donor 4 (1%)	1	4	1	1
Donor 5 (1%)	0	5	1	1
Donor 6 (2%)	2	16	6	0
Donor 7 (1%)	2	4	2	1
Donor 8 (2%)	2	10	4	0
Donor 9 (6%)*	5	42	4	0

Blood CD8⁺ cells were positively selected by magnetic sorting and labeled with antibodies.

*The percentages within parentheses were the percentages of CD25⁺ cells among the blood CD8⁺ T cells.

Table I. Percentage of CD25⁺ cells in different CD8⁺ blood-cell subsets

Discussion

The linear differentiation model proposes that upon antigenic stimulation the naive CD8 T cells, which are CD45RA⁺CCR7⁺, lose CD45RA to become central memory T cells, and then lose CCR7 to become effector memory cells. The observation that CCR7 can transiently be re-expressed by CCR7⁺ memory CD8⁺ T cells in the days following antigenic stimulation, as shown in previous reports ^(148,159,160), and confirmed here, implies that the stages proposed by the linear differentiation model define only resting T cells.

Some CCR7⁺ CD8⁺ T cells express CD45RA and these cells, which have been named T_{EMRA}, have been considered to be terminally differentiated because of their high content of perforin, because of their ability to secrete IFN- γ but not IL-2 following stimulation, and also because of their very low proliferation following TCR engagement ^(154,99). But this subset of blood T cells has been observed to be heterogeneous in terms of expression of granzyme B, FasL, TNF- α , and IFN- γ ⁽¹⁵⁵⁾. Our analysis of resting CTL

clones, which are always CCR7⁻, did not reveal any correlation between, on the one hand, their level of CD45RA expression and, on the other hand, their ability to secrete IL-2 and their lytic activity. CTL clones that were completely CD45RA⁺ showed considerable proliferative potential following antigenic stimulation. We extended these observations to blood cells, and observed that, in accordance with previous reports on antiviral T cells ^(156,157), the CD8⁺ CD45RA⁺CCR7⁻ subset showed also considerable proliferation following TCR engagement. We conclude that CD45RA⁺CCR7⁻ CD8⁺ T cells are by no means terminally differentiated.

We observed that, when cells of permanent CD8⁺ CTL clones, which were CD45RA⁺, received a TCR stimulation, CD45RA was lost at the onset of the activation phase, which lasted for about 2 weeks. The activation phase was followed by a longer phase of re-expression of CD45RA that appeared to be completed on all the cells after about 8 weeks. Thus the level of CD45RA increased with the time elapsed since the last antigenic stimulation. For CD45RA⁺CCR7⁻ blood CD8⁺ T cells, which also lose CD45RA after stimulation in vitro, re-expression of CD45RA was observed on a majority of cells after about 5 weeks. For CD45RA⁻CCR7⁻ blood CD8⁺ T cells, we observed the appearance of CD45RA on a large majority of cells 4 weeks after stimulation. We also observed the appearance of CD45RA on nearly half of the CD45RA⁻CCR7⁻ blood CD8⁺ T cells kept in culture without stimulation for 2 weeks. We conclude that CD45RA⁻ and CD45RA⁺ CCR7⁻ CD8⁺ blood T cells have the potential to acquire or reacquire CD45RA expression following a period without antigenic stimulation, but we do not claim that all CD45RA⁻ CCR7⁻ CD8⁺ T cells have this potential.

The reacquisition of CD45RA following a long absence of antigen does not appear to apply to CCR7⁻ CD4⁺ memory cells. In the blood, very few CD45RA⁺CCR7⁻

CD4⁺ cells are observed ⁽⁹⁸⁾. We have tested one anti-MAGE-3 CD4⁺ T-cell clone up to 90 days after an antigenic stimulation and have not observed acquisition of CD45RA.

A previous report showed that CCR7-positive CD45RA⁻ CD8⁺ T cells evolved into CD45RA⁺CCR7⁻ CD8⁺ T cells in the presence of IL-7 and IL-15 when no antigenic stimulation was provided ^(154,158,163). Our results suggest that the crucial factor was the absence of antigenic stimulation, but we agree that the presence of IL-7 and IL-15 may speed up the acquisition of CD45RA.

We therefore would like to call “activated T cells” those CD8⁺ T cells that have been stimulated by their antigen fewer than 10 ± 3 days before, as during that period they proliferate significantly, all of them transiently express CD25, and some of them express CCR7. After that time, only the lymphocytes that do not receive further antigenic stimulation enter into a slow and gradual process of re-expression of CD45RA, which is completed at the latest 10 weeks after stimulation, and we propose to name the lymphocytes that are in this process of reacquiring CD45RA “transitional resting T cells.” We propose to name “stable resting T cells” the lymphocytes that have reached the plateau for the expression of CD45RA.

The view that CD45RA is not a marker of terminal differentiation of memory CD8⁺ T cells, but results from a long-lasting absence of antigen, provides an alternative explanation for several published observations regarding the CD45RA phenotype of CTLs found in the course of various viral infections of humans. During the primary phase of infectious mononucleosis when both lytic and latent EBV proteins are expressed, the CTLs directed against these antigens were observed to have a uniform CD45RA⁻ phenotype ⁽¹⁰³⁾. In the persistent carrier state, latent EBV proteins are expressed continuously in infected cells, while the lytic proteins are found only in the very rare cells that are in lytic cycle ⁽¹⁰²⁾. At that stage, almost all of the CTLs directed

against the latent proteins were found to be CD45RA⁻, whereas most of those directed against the lytic proteins were CD45RA⁺ ^(163,103,157). This could be readily explained in terms of lack of antigenic stimulation allowing evolution into the CD45RA⁺ phenotype.

In an interesting study performed on patients in chronic phase of HIV infection, it was observed that the anti-HIV CTLs were CD45RA⁻, whereas the anti-CMV CTLs resulting from a past infection were CD45RA⁺ ⁽⁹⁹⁾. The proposed interpretation was that, following the CMV infection, CTLs had been able to differentiate properly into highly effective TEMRA, whereas HIV was somehow blocking this terminal differentiation—hence a less effective response against HIV than against CMV ^(99,100). We agree that a virus such as HIV could impair T-cell differentiation, but our observations suggest that an alternative interpretation should be considered, namely that the relatively high viral load observed in chronic HIV infection provided continuous antigenic stimulation and that the resting period was therefore too short to allow re-expression of CD45RA. In contrast, the anti-CMV CTLs of these patients had not been restimulated for a long time, allowing CD45RA re-expression. In line with this interpretation, another report showed that the anti-CMV CTLs were CD45RA⁻ during acute CMV infection ⁽¹⁵²⁾.

The notion that CD45RA⁺CD8⁺ T lymphocytes have seen their antigen at a distant time can also lead to reinterpretation of some observations made on cancer patients. Lymph nodes invaded with tumor cells were observed to contain a much higher proportion of CD45RA⁻CCR7⁻ lymphocytes than uninvaded lymph nodes ⁽¹⁶⁴⁾. As we recently found that in invaded lymph nodes and skin metastases of melanoma patients the majority of T cells appear to be directed against antigens borne by the tumor, the first observation can be readily explained: the CD45RA⁻CCR7⁻CD8⁺ T cells in invaded lymph nodes are stimulated by their antigen ⁽⁵⁶⁾. In another report, the

absence of CD45RA⁺CCR7⁻ T cells in ascites from cancer patients was taken as evidence that the T cells could not attack the tumor cells properly as they were not fully differentiated effectors ⁽¹⁶⁵⁾. We interpret this as showing that the T cells present in the ascites were stimulated by their antigens. Of course, it remains to be explained why they do not kill the tumor cells more efficiently. Finally, reports dealing with antimelanoma vaccination with antigens melan-A and gp-100 took the presence of CD45RA⁺CCR7⁻ CD8⁺ T cells in the blood as evidence of successful vaccination ^(166,106). We would be inclined to draw the opposite conclusion.

To conclude, we have observed that a large fraction of CCR7⁻ CD8⁺ T memory cells re-express CD45RA when they have not been in contact with their antigen for more than one month. Even though we cannot claim that this applies to all memory CD8⁺ T cells, this observation leads to new interpretations of several situations encountered in viral infections and cancer.

Acknowledgments

We thank Benoît Van den Eynde for critical reading, and Mrs Nathalie Krack and Valérie Winand for editorial assistance. We thank Bernard Lethé for the setup of quantitative PCRs. We also thank Nicolina Renkvist for experiments with CD4⁺ T cells. The anti-EBV clone DIPE6/8 was kindly provided by Vaïos Karanikas. We appreciated very much the technical assistance of Mr André Tonon, Mrs Maria Panagiotakopoulos, and Mrs Vinh Ha Thi.

Discussion et perspectives

1. Réponse lymphocytaire anti-tumorale et traitements anti-tumoraux

Le premier volet de notre travail confirme que les antigènes tumoraux utilisés dans des vaccins contre le mélanome peuvent induire une réponse anti-vaccinale. Cependant celle-ci est quantitativement minoritaire par rapport à une réponse anti-tumorale préexistante au traitement par vaccination. Ces observations confortent l'existence d'une immunosurveillance contre le cancer mais elles posent la question de son insuffisance pour contrôler la progression tumorale dans le cas de tumeurs métastatiques. L'identification des causes expliquant cette insuffisance, et la mise au point de stratégies thérapeutiques pouvant restaurer l'efficacité de cette réponse anti-tumorale, sont des voies de recherche qui sont actuellement explorées. Nous n'aborderons pas le premier aspect concernant les multiples mécanismes d'immunorésistance des tumeurs, et nous nous pencherons plutôt sur les aspects thérapeutiques. Nous illustrerons différentes options ayant pour but de potentialiser la réponse immune anti-tumorale, ou influençant cette dernière via des interactions initialement non suspectées.

1.1. Vaccination anti-tumorale

Chez la patiente LB2586, il existe une réponse CD8 anti-tumorale dans le sang ainsi que dans des métastases cutanées. Cette réponse anti-tumorale est présente avant toute immunothérapie. Cependant, un nouveau clonotype dirigé contre un antigène tumoral dérivé de la protéine MAGE-C2 apparaît après le début du traitement expérimental par vaccination avec le peptide MAGE-3.A1. Alors que la réponse CD8 anti-vaccinale ne semble pas se concentrer de manière importante dans la tumeur, le clonotype dirigé contre MAGE-C2 s'amplifie et se concentre fortement dans les métastases cutanées au cours de la période de vaccination. Des observations similaires ont été décrites par Coulie et son équipe chez un autre patient présentant un mélanome métastatique traité

par vaccination anti-tumorale ^(128,56). L'hypothèse proposée par notre laboratoire sur base de ces observations est que ces nouveaux clonotypes anti-tumoraux ont probablement été induits indirectement par la vaccination ^(139, 167).

1.2. Immunomodulateurs

Des traitements immunomodulateurs ont été testés chez des patients cancéreux, dans le but de stimuler une immunité anti-tumorale spontanée préexistante. Au cours des années 1990, certains patients traités pour un mélanome métastatique par de hautes doses d'IL-2 ont présenté des réponses thérapeutiques étonnamment prolongées ⁽¹⁶⁸⁾. Cette approche thérapeutique a été affinée grâce à une meilleure compréhension des mécanismes inhibant l'activation des lymphocytes T dans l'environnement tumoral, parallèlement à l'avènement de thérapies permettant de cibler précisément des récepteurs à la surface des cellules grâce à des anticorps monoclonaux. Ainsi, en 2011, un essai clinique a démontré que le blocage du récepteur inhibiteur CTLA-4 exprimé par les lymphocytes T, grâce à un anticorps monoclonal dénommé ipilimumab, permettait d'améliorer la survie de patients atteints de mélanome métastatique, au prix néanmoins d'effets secondaires de type auto-immuns ⁽¹⁶⁹⁾. En 2012, des études de phase I testant la tolérance de traitements par anticorps monoclonaux bloquant PD-1, un autre récepteur inhibiteur des lymphocytes T, ou le ligand de ce récepteur (PD-L1), ont été publiées. Chacune de ces études a été menée chez plus de 200 patients atteints de cancers divers très évolués. Ces traitements ont non seulement un profil de tolérance intéressant car ils semblent moins toxiques que l'ipilimumab, mais surtout ils semblent efficaces avec 6 à 28% des patients traités présentant une régression tumorale persistant souvent au-delà d'un an ^(169,170). Ces bons résultats pourraient s'expliquer par une potentialisation d'une réponse anti-tumorale spontanée. Néanmoins, pour arriver à une

telle conclusion, les lymphocytes T effecteurs anti-tumoraux devraient être identifiés et l'influence du traitement sur ces derniers analysée.

1.3. Chimiothérapies et thérapies ciblées

L'interaction entre un traitement anti-cancéreux et la réponse immune anti-tumorale est une notion qui ne se limite peut-être pas aux traitements par immunothérapie. Certaines observations chez l'homme suggèrent que les interactions entre des traitements de chimiothérapies et une réponse immune anti-tumorale préexistante pourraient avoir un rôle important. En 2010, Denkert a évalué la réponse anatomopathologique chez plus de 1000 patientes atteintes d'un cancer du sein localisé et recevant un traitement de chimiothérapie avant l'exérèse de la tumeur (chimiothérapie néoadjuvante). Il a ensuite corrélé l'importance de cette réponse avec la présence d'un infiltrat lymphocytaire B et T dans les biopsies initiales réalisées avant le début de la chimiothérapie. Il a constaté que 42 % des patientes ayant des tumeurs initialement infiltrées par des lymphocytes T ou B présentaient, après la chimiothérapie néoadjuvante, une réponse anatomopathologique complète, alors que le taux de réponses complètes chutait à 3% chez les patientes dont la tumeur n'était pas infiltrée ⁽¹⁷²⁾. L'expression du gène codant pour la chaîne delta du complexe membranaire CD3 présent sur les lymphocytes T, était corrélée avec les réponses anatomopathologiques complètes. Halama et Jaeger sont arrivés à une conclusion identique chez des malades avec des métastases hépatiques de cancer colique et recevant un traitement de chimiothérapie avant l'exérèse des métastases ⁽¹⁷³⁾. Ces résultats indiquent que l'infiltration tumorale par des lymphocytes T permet de prévoir une réponse au traitement de chimiothérapie. Cette interaction reste à ce jour inexpliquée, mais une éventuelle potentialisation de la réponse lymphocytaire anti-tumorale suite aux traitements de chimiothérapie n'est pas exclue.

En effet, de nombreuses molécules de chimiothérapie utilisées en oncologie semblent avoir des influences positives ou négatives sur l'action anti-tumorale du système immunitaire ⁽¹⁷⁴⁾. Le cyclophosphamide à doses élevées (500-1000 mg/m²) fait partie du traitement de nombreux cancers. Depuis les années 1980, de nombreuses observations ont suggéré que cette drogue utilisée à faible dose (300 mg/m²) pourrait avoir un effet immunostimulant ^(174,175). Au cours des dernières années, l'existence de lymphocytes T régulateurs ayant un rôle immunosuppresseur a semblé se confirmer et certains auteurs proposent que l'effet immunostimulant du cyclophosphamide à faible dose passerait par une élimination de ces derniers, voire même par une réduction de leur activité régulatrice via la diminution de l'expression du facteur de transcription FOXP3 ou de la protéine «glucocorticoid-induced TNF-receptor-related » (GITR) ⁽¹⁷⁷⁾. Plus récemment, il a été proposé que même des traitements ciblés comme l'imatinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase spécifique de la protéine de fusion résultant de la translocation des gènes *BCR-ABL*, pourrait avoir en plus un effet immunostimulant en agissant sur les cellules NK ou sur certaines cellules dendritiques ^(177,178). Ces interactions entre des traitements anti-cancéreux et le système immunitaire restent mal identifiées chez l'homme car la majorité des travaux réalisés concernait des modèles murins. Des études ont été menées chez l'homme pour valider d'éventuelles synergies entre des traitements de chimiothérapie et la réaction immune anti-tumorale, mais pour l'instant, elles n'ont abouti à aucune application clinique.

Il semble donc que certains traitements anti-cancéreux interagissent avec la réponse anti-tumorale spontanée. Dans certains cas cette interaction était activement recherchée, dans d'autres cas elle était inattendue. Il serait dès lors judicieux d'intégrer l'évaluation de ces synergies dans les futurs essais cliniques en oncologie, mais la

difficulté à définir et à mesurer la réponse immune anti-tumorale reste un obstacle important dans cet effort de systématisation.

2. Limites des marqueurs phénotypiques pour identifier des états de différenciation lymphocytaire

Un autre volet de notre travail a eu pour but de caractériser l'état fonctionnel et l'état de différenciation des clones lymphocytaires T CD8 dirigés contre l'antigène MAGE-3.A1 isolés du sang de patients atteints de mélanome métastatique et vaccinés avec cet antigène. Au-delà de la caractérisation précise de ces clones amplifiés *in vitro*, nos différentes observations nous ont amenés à questionner l'utilisation de certains récepteurs lymphocytaires, comme CD45 et ses différentes isoformes, en tant que marqueurs de différenciation.

2.1. Diversité importante de la population lymphocytaire T

De nombreux travaux sur les lymphocytes T ont démontré l'existence de sous-populations ayant des différences fonctionnelles et caractérisées par l'expression de marqueurs phénotypiques. Très vite, ce constat d'hétérogénéité a été associé au concept de la différenciation lymphocytaire. Ainsi plusieurs hypothèses ont été proposées, chacune mettant en avant un modèle de différenciation du lymphocyte T passant d'un état naïf à un état effecteur ou mémoire.

L'identification de chacun des états de différenciation au moyen de marqueurs phénotypiques spécifiques est cependant loin de correspondre à une réalité. Des marquages multi-couleurs utilisant 5 marqueurs phénotypiques en parallèle (CD45RA, CD62L, CD11a, CD27 et CD28), démontrent qu'il faut combiner simultanément 3 de ces marqueurs pour identifier la population des lymphocytes T CD8 naïfs avec une spécificité supérieure à 90% ⁽¹⁸⁰⁾. Cette approche multiparamétrique permet une détermination de plus en plus précise des sous-populations lymphocytaires T.

Parallèlement, la combinaison simultanée d'un nombre croissant de marqueurs ne cesse de révéler de nouvelles sous-populations parmi les lymphocytes T, remettant constamment en question les tentatives de catégorisation antérieures.

Les analyses de séquençage à haut débit remettent également en question les conclusions obtenues par analyse phénotypique au moyen de la cytométrie en flux. Ainsi, une analyse génétique du transcriptome des lymphocytes T réalisée par Gattioni en 2011, montre que la sous-population T naïve, caractérisée par le phénotype $CD45RA^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^+$, contient un petit nombre de lymphocytes T mémoire ayant des propriétés d'auto-renouvellement similaires à celles des cellules souches ⁽¹⁸¹⁾. Ces résultats confirment l'extrême hétérogénéité des lymphocytes T et soulignent les limites des modèles de différenciation proposés.

2.2. Voies de différenciation incertaines des lymphocytes T

La modélisation de la différenciation lymphocytaire T se heurte à différents obstacles: (1) la difficulté d'identifier les éléments qui déclenchent et contrôlent cette différenciation, et (2) la difficulté de déterminer la filiation entre les différentes sous-populations correspondant aux différents stades de différenciation. Ce constat est valable pour les lymphocyte T CD4 et CD8, mais la réflexion qui suit est centrée sur le compartiment CD8, tenant compte que notre travail a été consacré à cette sous-population lymphocytaire.

Pour préciser les voies de différenciation, des expériences avec des traceurs cellulaires *in vivo* ont été réalisées chez la souris. Le contact antigénique initial semble déclencher un programme de différenciation du lymphocyte T CD8 naïf. Selon S. Kaech et R. Ahmed, ce programme se déroulerait de manière automatique sans nécessité de nouveaux contacts antigéniques, et ce, jusqu'à la formation de lymphocytes T CD8 mémoire ⁽¹⁸²⁾. F. Sallusto et A. Lanzavecchia ont introduit la notion d'intensité de la

stimulation initiale. Ils ont proposé non pas un seul programme de différenciation mais plusieurs. Ceux-ci aboutiraient à différents types de populations mémoire et, en fin de parcours, à une population d'effecteurs terminaux ⁽¹⁸³⁾. La sélection entre ces différents programmes serait déterminée par l'intensité de la stimulation antigénique initiale du lymphocyte T CD8 naïf. Si le concept de programme(s) de différenciation est actuellement admis, la filiation entre les différentes populations lymphocytaires T intervenant dans ce programme, et de manière plus générale entre les cellules effectrices et les cellules mémoire, reste matière à débat ⁽¹⁸⁴⁾. D'autre part, de nombreuses informations concernant les voies de différenciation des lymphocytes T proviennent de modèles murins et ne sont peut-être pas applicables à l'homme ⁽¹⁸⁵⁾.

L'analyse des réponses lymphocytaires T après vaccination préventive contre des pathologies virales a été utilisée par certains auteurs pour appréhender cette question chez l'homme. Miller et Ahmed ont publié en 2008 une analyse longitudinale des réponses CD8 après vaccination contre le virus de la variole ⁽¹⁸⁶⁾. Dans ce modèle d'infection virale aiguë transitoire, les auteurs démontrent l'amplification d'une population de lymphocytes T anti-vaccinaux dans les deux semaines suivant la vaccination. Cette population exprime un phénotype CD45RA⁻/CCR7⁻ et possède des caractéristiques fonctionnelles effectrices. Une vingtaine de jours après la vaccination, les auteurs observent une phase de contraction de la réponse avec persistance de lymphocytes T CD8 mémoire. Ceux-ci sont caractérisés par l'absence du marqueur d'activation HLA-DR, l'expression du récepteur de l'IL-7 ou CD127, l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl2 et un phénotype CD45RA⁺/CCR7⁻. Leurs observations supportent un modèle linéaire où les lymphocytes T CD8 passent tout d'abord par un stade d'effecteur obligatoire puis certains d'entre eux persistent et se différencient en cellules mémoire.

2.3. Confusion entre activation et différenciation

Les modifications phénotypiques des lymphocytes T CD8 peuvent être associées à une différenciation cellulaire. Cependant, certaines de ces modifications semblent varier de manière cyclique selon que les lymphocytes passent d'un état de repos à un état activé ou inversement, en fonction des contacts avec leurs antigènes. C'est le cas pour CCR7 qui, selon certains auteurs, est transitoirement réexprimé après stimulation antigénique des lymphocytes T CD8 CCR7⁻ ^(159,160). Nous avons reproduit ces observations sur des clones lymphocytaires T CD8 stimulés par leur antigène *in vitro*, tout en notant que cette réexpression transitoire semble être restreinte à certaines cellules au sein de la population clonale, cellules qui ont une capacité de prolifération importante.

Si ces observations sont intégrées aux modèles de différenciation proposés dans la littérature, l'expression de CCR7 serait constitutive dans la sous-population des lymphocytes T CD8 naïfs qui maintiennent un phénotype CCR7⁺ tant que le contact antigénique n'a pas eu lieu. Cette expression serait également constitutive pour la sous-population CD45RA⁻/CCR7⁺ ou «T_{CM} - mémoire centrale». Au cours de nos expériences *in vitro*, nous n'avons pu isoler aucun clone lymphocytaire ayant un phénotype stable CD45RA⁻/CCR7⁺. Geginat décrit par contre des clones lymphocytaires T CD8 exprimant ce phénotype de manière stable après clonage *ex vivo* de cellules CD45RA⁻/CCR7⁺ ⁽¹⁵⁴⁾. Nous pensons que pour la sous-population CD45RA⁻/CCR7⁻ ou «T_{EM} – mémoire effectrice», l'expression de CCR7 serait inductible suite à l'activation antigénique, et cela uniquement chez certaines cellules ⁽¹⁸⁷⁾.

Ces différents constats illustrent la difficulté à distinguer un marqueur d'activation des lymphocytes T CD8 d'un marqueur de différenciation lymphocytaire. Force est de constater que les modèles proposés dans la littérature ne semblent

applicables que si l'on considère des populations lymphocytaires au repos, ce qui est probablement loin de correspondre à la réalité *in vivo*.

3. CD45RA, marqueur de « repos » des lymphocytes T CD8

La réexpression de l'isoforme CD45RA par les lymphocytes T CD8 a été considérée comme un signe de différenciation terminale. En effet, ces cellules contiennent d'importantes quantités de perforine et sont capables de produire de l'IFN γ , mais auraient un faible potentiel de prolifération après stimulation via le TCR^(98,99). Parmi les clones lymphocytaires T CD8 que nous avons amplifiés *in vitro*, certains exprimaient CD45RA et aucun n'exprimait CCR7 en absence de stimulation. Ces lymphocytes étaient capables de proliférer et pour certains de produire de l'IL-2, ce qui est en discordance avec les fonctions attendues chez des lymphocytes T en différenciation terminale. La discordance entre le phénotype CD45RA⁺/CCR7⁻ et le profil de différenciation terminale avait déjà été relevée par Dunne en 2002. Il avait constaté que parmi les lymphocytes T CD8 dirigés contre l'épitope lytique RAK du virus EBV, ceux qui exprimaient un phénotype CD45RA⁺/CCR7⁻ après résolution de la phase aiguë de l'infection, étaient capables de proliférer après une stimulation antigénique *in vitro*⁽¹⁵⁷⁾. Sur base de cette publication ainsi que de nos observations, notre conclusion est que les lymphocytes T CD8 CD45RA⁺/CCR7⁻ ne correspondent pas à des lymphocytes dans un état de différenciation terminale.

Un suivi chronologique de l'expression de CD45RA et de CD45RO après une stimulation antigénique *in vitro*, dans des conditions permettant un contrôle strict de l'apport d'antigène, nous a permis d'observer une variation cyclique et inversée des deux isoformes. CD45RO est exprimé rapidement 24 heures après la stimulation antigénique au détriment de CD45RA, puis on assiste à une réexpression progressive de l'isoforme CD45RA en l'absence de nouvelle stimulation antigénique avec disparition

de l'isoforme CD45RO. Nos observations *in vitro* ne valident pas l'utilisation de CD45RA et de CD45RO en tant que marqueurs de différenciation pour les lymphocytes T CD8 car leur expression ne semble pas corrélée à un profil fonctionnel particulier. Par contre ces deux marqueurs semblent plutôt refléter le délai par rapport au dernier contact antigénique. Nous proposons d'interpréter l'expression de CD45RO comme la conséquence d'un contact antigénique récent et l'expression de CD45RA comme le reflet d'une absence prolongée de contact antigénique.

La possibilité que l'expression de CD45RA soit liée à une absence de stimulation antigénique et que ce marqueur caractérise l'état de « repos » des lymphocytes T CD8 semble confortée par les observations publiées par Duraiswamy et Ahmed en 2011. Ils ont analysé l'expression de la protéine membranaire «Programmed Death-1 » (PD-1) chez des sujets sains. Le récepteur PD-1, membre de la famille des protéines ayant un rôle immunomodulateur inhibiteur, est exprimé par les lymphocytes T après activation antigénique. PD-1 est également exprimé sur des lymphocytes T CD8 chroniquement stimulés et interviendrait dans les mécanismes « d'épuisement lymphocytaire » ⁽¹⁸⁸⁾. Les auteurs ont constaté que PD-1 est majoritairement exprimé par la sous-population de lymphocytes T CD8 qui exprime CD45RO et pas CD45RA ⁽¹⁸⁹⁾. Or, l'expression de PD-1 aurait été attendue préférentiellement sur les lymphocytes T CD8 effecteurs en état de différenciation terminale, soit sur base du modèle de différenciation consensuel (cf. p30), ceux qui réexpriment CD45RA. Par contre, les résultats de Duraiswamy sont en cohérence avec une expression de CD45RO lors de l'activation antigénique des lymphocytes T CD8 et une réexpression de CD45RA suite à l'absence de stimulation antigénique comme nous le proposons.

Les variations cycliques de l'expression de CD45RA et CCR7, observées chez les CD8 non naïfs après une stimulation antigénique, compromettent l'utilisation de ces protéines membranaires en tant que marqueurs de différenciation lymphocytaire. Nous proposons donc de reconsidérer le modèle linéaire tel que proposé dans la littérature (Figure 6).

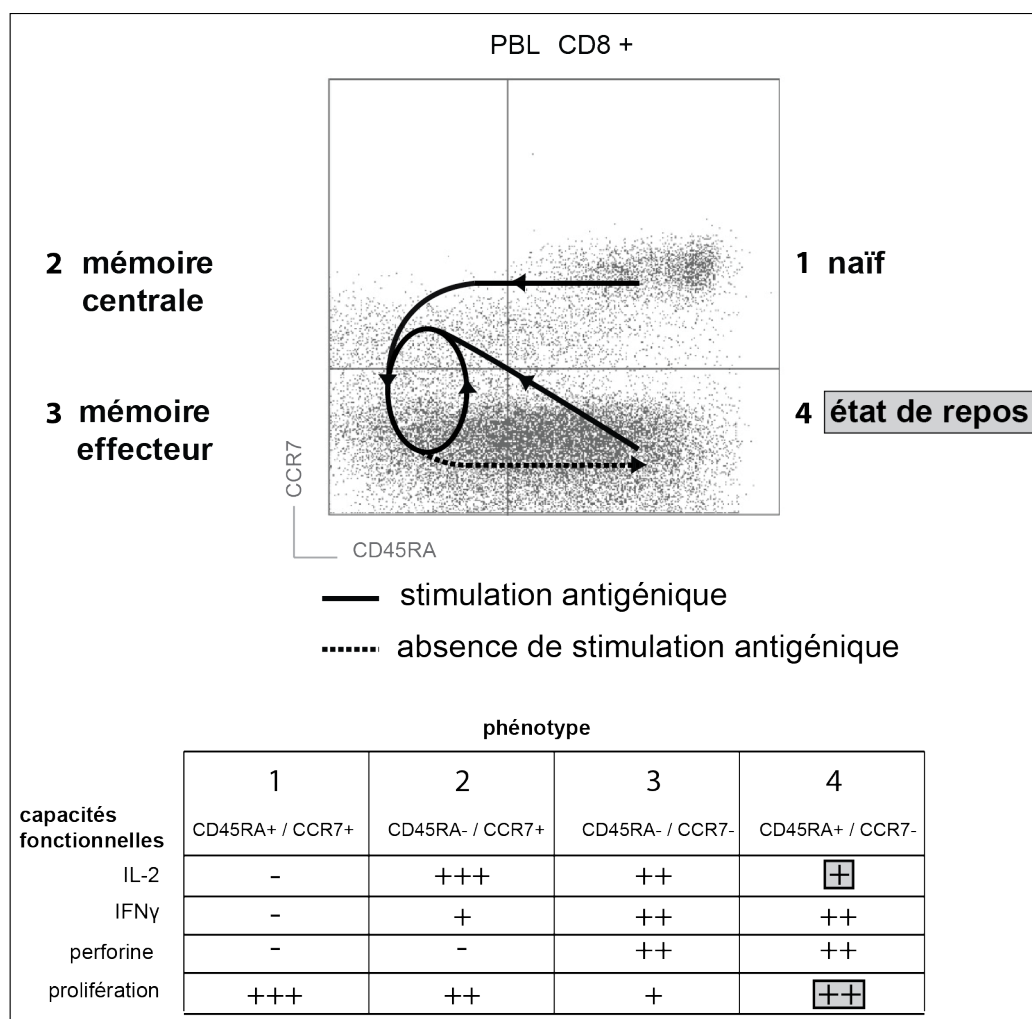


Figure 6 **Modèle de différenciation des lymphocytes T CD8 revisité**

L'expression de CCR7 et de CD45RA varie en fonction des stimulations antigéniques. Les variations phénotypiques après stimulation antigénique sont symbolisées dans le schéma par les flèches en ligne continue. La flèche en pointillés symbolise la réexpression de CD45RA par les CD8 non naïf après un long délai sans stimulation antigénique. Ces CD8 réexprimant CD45RA gardent une capacité de prolifération importante après activation antigénique. La réexpression de CD45RA ne caractérise donc pas un état de différenciation terminale mais correspond plutôt à un état de repos des CD8.

4. Réinterprétation de la littérature concernant la différenciation des lymphocytes T CD8

4.1. Pathologies virales

Chez les patients infectés par le virus HIV, le fait que la plupart des lymphocytes T CD8 dirigés contre le virus HIV aient un phénotype CD45RA⁺/CCR7⁺ a été interprété par Champagne comme une anomalie de la différenciation entraînant l'absence de lymphocytes T CD8 au stade d'effecteurs terminaux ⁽⁹⁹⁾.

Les patients analysés par Champagne présentaient une infection par HIV active et non traitée avec par conséquent une charge virale importante. Dans ces conditions, il est probable que les lymphocytes T CD8 anti-HIV aient été régulièrement activés par des contacts antigéniques. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs décrit une suractivation chronique des lymphocytes T chez des patients infectés par le virus HIV en absence de thérapie anti-virale, se traduisant entre autre par une proportion importante de lymphocytes T exprimant des marqueurs d'activation comme CD38 ou HLA-DR ⁽¹⁹⁰⁾. En 2009 Lécuroux a remarqué une réexpression de CD45RA par les lymphocytes T CD8 anti-HIV chez des patients infectés recevant une thérapie anti-virale efficace ⁽¹⁹¹⁾. Ce traitement anti-viral entraînait une diminution drastique de la charge virale et par conséquent de la prévalence des antigènes. Dans ces conditions, les lymphocytes T CD8 anti-HIV ne devaient être que rarement activés par un contact antigénique. La relation inverse entre l'expression de CD45RA et l'absence de stimulations antigéniques des lymphocytes T CD8 permet d'expliquer les observations paradoxales de ces deux auteurs. La conclusion de Lécuroux est la suivante : la réexpression de CD45RA par des lymphocytes T CD8 anti-HIV semble liée à la diminution de la charge antigénique induite par le traitement anti-viral, et caractérise des lymphocytes T CD8 mémoire au repos. Cette conclusion est en accord avec nos observations *in vitro* ⁽¹⁸⁷⁾

Dans diverses maladies virales comme les infections par EBV ou CMV, qui sont caractérisées par une importante charge antigénique lors de l'infection, les lymphocytes T CD8 anti-viraux amplifiés lors de la phase aiguë de l'infection n'expriment pas CD45RA^(103,191). Ce n'est que lors de la résolution de cette phase aiguë que l'on voit apparaître des lymphocytes T CD8 anti-viraux qui réexpriment CD45RA^(192,103,191). Dans le cas de l'infection par EBV, des protéines latentes sont exprimées chroniquement, au-delà de la phase aiguë de l'infection. Il est intéressant de constater que les lymphocytes T CD8 dirigés contre des antigènes dérivés de ces protéines sont les seuls à garder majoritairement un phénotype CD45RO, en ne réexprimant que très faiblement CD45RA⁽¹⁰³⁾.

Les différences d'expression de CD45RA par les lymphocytes T CD8 anti-viraux sont surtout marquées après la phase aiguë de l'infection. Nous interprétons ces variations comme étant le reflet de la charge antigénique pour chacun des antigènes viraux : CD45RA ne serait pas exprimé par les lymphocytes anti-viraux lorsque la prévalence de l'antigène reconnu est élevée, entraînant des contacts antigéniques fréquents. CD45RA serait réexprimé lorsque, suite à une diminution de la charge antigénique, les contacts antigéniques seraient espacés ou absents.

Cette interprétation questionne également la qualification d'effecteurs terminaux pour les lymphocytes T CD8 réexprimant CD45RA. Ce serait plutôt des lymphocytes T CD8 mémoire au repos. Cette proposition est en accord avec plusieurs publications rapportant que des lymphocytes T CD8 non naïfs anti-HIV, anti-EBV ou anti-CMV qui réexpriment CD45RA sont résistants à l'apoptose et gardent des capacités de prolifération importantes après une nouvelle stimulation antigénique^(190,157,193).

D'autres observations confortent un lien entre l'expression de CD45RA et l'absence de stimulation antigénique. Dans l'analyse chronologique des réponses CD8

anti-vaccinales après vaccination contre la variole, Miller et Ahmed montrent que lors de l'amplification initiale de la réponse CD8 anti-vaccinale au cours des 20 premiers jours suivant la vaccination, la majorité des CD8 anti-vaccinaux n'expriment pas CD45RA ⁽¹⁸⁶⁾. Ensuite, au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la vaccination, les auteurs observent une réexpression progressive de CD45RA par les lymphocytes anti-vaccinaux. Celle-ci concerne plus de 90% de ces derniers, 6 mois après la vaccination ⁽¹⁸⁶⁾. La cinétique d'expression de CD45RA observée *in vivo* dans ce modèle humain est très proche de nos observations sur des clones CTL anti-tumoraux *in vitro*.

4.2. Pathologies tumorales

Des analyses phénotypiques des lymphocytes T CD8 dirigés contre des antigènes tumoraux ont également été réalisées. Les réponses spontanées anti-tumorales ou celles induites par des vaccinations atteignent des fréquences nettement inférieures à celles observées dans les réponses anti-virales. Les analyses phénotypiques *ex vivo* sont donc plus difficiles à réaliser.

Début des années 2000, Dunbar et Cerundolo ont analysé les réponses dirigées contre un antigène dérivé de Melan-A, une protéine de différenciation mélanocytaire, chez 26 patients atteints de mélanome tous stades confondus ⁽¹⁹⁵⁾. Une réponse fut détectée chez 13 patients. La fréquence la plus élevée atteignait 0,3% des CD8 sanguins, fréquence suffisamment élevée que pour permettre une analyse phénotypique *ex vivo*. Chez 7 patients, les lymphocytes T CD8 anti-Melan-A avaient un phénotype CD45RA⁺/CCR7⁺ caractérisant l'état naïf. Les auteurs ont constaté que des lymphocytes naïfs anti-Melan-A étaient également présents à des fréquences similaires chez la moitié des sujets sains analysés en tant que contrôles. Ils en conclurent que ces lymphocytes ne pouvaient être considérés comme une réponse anti-tumorale, mais

qu'ils correspondaient plutôt au répertoire naïf anti-Melan-A particulièrement riche. Chez les 6 autres patients, les lymphocytes T CD8 anti-Melan-A avaient un phénotype CD45RA⁻/CCR7⁻.

Valmori et, quelques années plus tard, Maczek ont également analysé les réponses dirigées contre des antigènes dérivés de protéines de différenciation mélanocytaire chez des patients atteints de mélanome. En utilisant des tétramères, ils ont analysé les lymphocytes T CD8 dirigés contre Melan-A et tyrosinase^(195,196). Ils ont constaté que ces lymphocytes étaient majoritairement CD45RA⁺/CCR7⁻. En analogie avec les observations de Dunne dans la réponse anti-EBV⁽¹⁵⁷⁾, Valmori a remarqué que malgré leur profil phénotypique d'effecteurs terminaux, les lymphocytes anti-tyrosinase gardaient des capacités de prolifération *in vitro* après stimulation avec le peptide antigénique.

Il existe donc une importante variabilité de l'expression de CD45RA par les lymphocytes T CD8 dirigés contre des antigènes de différenciation mélanocytaire participant à une réponse anti-tumorale. Cette variabilité peut même se retrouver au sein d'un même patient. Ainsi chez des patients atteints de mélanome, dans les ganglions envahis par la tumeur, les lymphocytes T CD8 dirigés contre des antigènes provenant des protéines gp100 et Melan-A ont souvent un phénotype CD45RA⁻/CCR7⁻, alors que dans le sang, les CD8 anti-Melan-A non naïfs et les CD8 anti-gp100 sont majoritairement CD45RA⁺/CCR7⁻⁽¹⁰⁴⁾.

Cette variabilité phénotypique a été interprétée sur base du modèle de différenciation lymphocytaire proposé par Lanzavecchia et Champagne⁽⁹⁹⁾⁽¹⁵⁸⁾. Ainsi l'absence de lymphocytes T CD8 anti-tumoraux CD45RA⁺/CCR7⁻ a souvent été considérée comme le signe d'une réponse immune anti-tumorale peu efficace car liée à un déficit en effecteurs terminaux. Notre interprétation est différente : tel que proposé

précédemment dans le cadre de pathologies virales, la réexpression de CD45RA serait un reflet de l'absence de contact entre les lymphocytes anti-tumoraux et leurs antigènes. Dans le cadre des tumeurs, de nombreux facteurs peuvent influencer la survenue de contacts entre les lymphocytes et leurs antigènes. Probablement, le premier de ces facteurs est l'importance de la charge tumorale. Les variations de cette charge tumorale d'un patient à un autre, mais également entre le sang et les organes envahis par la tumeur, pourraient expliquer l'hétérogénéité de l'expression de CD45RA par les lymphocytes T CD8 anti-tumoraux. Cette vision est sans doute simpliste, car, si la présence de l'antigène est nécessaire à une activation des lymphocytes T CD8 anti-tumoraux, elle n'est peut-être pas suffisante dans certains cas. En effet, de multiples mécanismes d'immuno-résistance ont été décrits dans de nombreuses tumeurs qui tout en étant antigéniques, peuvent se révéler faiblement immunogéniques. Nous pensons que la présence de lymphocytes T CD8 anti-tumoraux CD45RA⁻ ou CD45RO⁺ pourrait être le reflet d'une réponse anti-tumorale active. A l'inverse, la réexpression de CD45RA témoignerait d'une absence de stimulation antigénique par la tumeur soit par disparition de celle-ci, soit suite à un échappement de celle-ci par rapport à la réponse lymphocytaire T CD8 anti-tumorale.

Nous faisons ainsi l'hypothèse que l'expression de CD45RO par les lymphocytes T CD8 anti-tumoraux pourrait être un marqueur d'une réponse potentiellement efficace plutôt que la conséquence d'une anomalie ou un blocage de leur différenciation. Certaines observations semblent appuyer cette interprétation. Plusieurs analyses corrélatives montrent une influence favorable de l'infiltrat tumoral lymphocytaire T CD8 sur le pronostic des patients atteints de différents types de cancers (59,16,58). Ce nouveau facteur pronostique semble mieux prédire le risque de rechute que les classifications tenant compte de la taille de la tumeur, de l'infiltrat ganglionnaire et

de la présence de métastases (TNM) ⁽¹⁹⁸⁾. Le marqueur CD45RO a été utilisé en plus du marqueur CD8 lors de l'évaluation de l'infiltrat lymphocytaire intra- et peritumoral. Ainsi, un marquage CD45RO a été réalisé par immunohistochimie (IHC) sur des tumeurs coliques primitives provenant de 336 patients sélectionnés de manière rétrospective. Environ la moitié des patients présentaient des tumeurs fortement infiltrées par des cellules CD45RO⁺ (> 250 cellules marquées par mm²). 47% de ces patients étaient en vie 5 ans après le diagnostic contre 24 % des patients ayant une tumeur faiblement infiltrée ⁽⁵⁹⁾. L'expression de CD45RO (ou l'absence de CD45RA) par les cellules infiltrant les tumeurs coliques est donc un facteur de bon pronostic.

Une analyse de l'infiltrat lymphocytaire tumoral par les marqueurs CD8 et CD45RO a été réalisée chez 610 patients présentant des tumeurs coliques de stade II sans infiltration ganglionnaire. 86 % des patients ayant une tumeur avec un infiltrat dense de cellules CD8⁺ et de cellules CD45RO⁺ étaient en vie 5 ans après le diagnostic, alors que la survie chutait à 28 % chez les patients ayant une tumeur avec un faible infiltrat de cellules exprimant l'un ou l'autre des deux marqueurs ⁽¹⁹⁹⁾. Les auteurs n'ayant pas réalisé de co-marquage par les deux marqueurs, il n'était pas possible de prouver que les cellules exprimant CD8 et celles exprimant CD45RO étaient les mêmes. Néanmoins, il est probable que la présence simultanée de ces deux marqueurs s'explique par un infiltrat tumoral riche en lymphocytes T CD8 exprimant CD45RO, et que ceux-ci soient un facteur déterminant pour le pronostic du patient. La corrélation entre un pronostic favorable et le marqueur CD45RO a été démontrée dans plus de 20 types de cancers différents ⁽⁵⁸⁾, mais, à notre connaissance, toujours sur base d'analyses rétrospectives. Pour l'instant, ce paramètre n'est pas appliqué dans la pratique clinique courante.

5. Analyse de l'infiltration lymphocytaire dans des tumeurs mammaires primitives

Malgré la présence dans le sang et dans les lésions métastatiques de lymphocytes T CD8 dirigés contre les antigènes tumoraux, le mélanome de la patiente LB2586 était en progression avant son inclusion dans le protocole de vaccination anti-tumorale ⁽⁵⁷⁾. La réponse anti-tumorale spontanée n'était donc pas suffisante pour contrôler la croissance de la tumeur. De nombreuses observations corroborent cette insuffisance de la réponse lymphocytaire T pour contrôler la progression de tumeurs étendues. Ce constat semble en contradiction avec l'effet protecteur de l'infiltrat lymphocytaire démontré chez des patients ayant des tumeurs localisées. Ceci suggère que les réponses immunes anti-tumorales dans des cancers précoces pourraient être plus efficaces que dans des tumeurs très étendues. Il semble donc important de mieux comprendre les interactions entre des tumeurs localisées et le système immunitaire.

Les études montrant un effet protecteur du système immunitaire sur le pronostic de patients après l'exérèse de cancers localisés sont des analyses corrélatives. Elles essayent de corréler l'évolution clinique des patients et l'infiltration lymphocytaire T, l'expression de gènes liés à des fonctions des cellules T ou la présence de chemokines dans l'environnement tumoral. Ces événements peuvent en effet refléter l'interaction entre le cancer et le système immunitaire. Cependant la spécificité antigénique des lymphocytes T infiltrant ces tumeurs est souvent inconnue. Cette information est pourtant indispensable pour valider l'existence d'une réponse anti-tumorale. Cependant, étant donné la méconnaissance des mécanismes immunologiques précis qui se déroulent dans la majorité des tumeurs précoces, les conclusions des études corrélatives réalisées risquent d'être sur-interprétées. De plus, ces analyses sur base d'études rétrospectives mériteraient d'être confrontées à des analyses sur des cohortes de patients suivis prospectivement.

Sur base de cette réflexion et nous appuyant sur notre expérience dans le domaine de l'« immunomonitoring », nous avons mis au point une première étude visant à déterminer si une réponse anti-tumorale spontanée existe chez des patientes atteintes de cancer du sein à un stade précoce. Pour cela, en collaboration avec le Pr. Machiels (Cliniques Universitaires St Luc – Bruxelles), le Dr. Canon (Grand Hôpital de Charleroi – Charleroi) et le Dr. Godelaine (Ludwig Institute – Bruxelles), nous recherchons dans le sang des patientes des réponses lymphocytaires T CD8 contre des antigènes dérivés de protéines surexprimées dans les cancers du sein comme Her2Neu, Telomérase et MUC-1. Nous nous intéressons également aux réponses contre des antigènes spécifiques de tumeur comme ceux dérivés des protéines MAGE-C2, NY-ESO-1 et Nectin-4 qui sont parfois exprimées par des tumeurs mammaires. Dans cette étude il est également prévu d'analyser par IHC l'infiltrat lymphocytaire T au centre et à la périphérie des tumeurs en utilisant des marquages CD8 et CD3. Un marquage CD45RO est également prévu car sur base de nos observations préalables sur les cellules CD8⁺ ⁽¹⁸⁷⁾, ce marqueur témoignerait d'une réponse lymphocytaire T CD8 en contact régulier avec les antigènes cibles, réponse potentiellement efficace. La présence d'une réponse CD8 anti-tumorale spontanée, ainsi que l'existence d'une infiltration tumorale par des lymphocytes T sera corrélée prospectivement à la survie sans rechute des patientes incluses dans l'étude.

Nos observations révèlent que parmi les 59 patientes incluses à ce stade de l'étude en cours, ± 20% présentent une réponse spontanée contre un des antigènes sélectionnés. Les fréquences mesurées dans le sang sont très faibles (± 2 / 1.000.000 des CD8), mais néanmoins supérieures aux fréquences observées lorsque les mêmes mesures sont réalisées chez des contrôles sains (± 3 / 10.000.000 des CD8).

Nous allons réorienter une partie de nos efforts en nous intéressant aux réponses lymphocytaires T CD8 dirigées contre des antigènes engendrés par l'instabilité génétique inhérente aux tumeurs car nous pensons que ceux-ci sont probablement plus immunogéniques. En effet, l'instabilité génétique des tumeurs se traduit parfois par la synthèse de protéines tronquées. D'un point de vue immunologique, ces protéines sont intéressantes car les antigènes qui en dérivent ne sont pas reconnus comme faisant partie du « soi », et il n'existe donc pas de tolérance par rapport à eux. Ce projet vise à démontrer formellement que des lymphocytes T infiltrant des carcinomes mammaires primitifs, avant leur extension métastatique, reconnaissent des antigènes strictement spécifiques des cellules tumorales, encodés par des gènes mutés dans la tumeur. Ceci consoliderait l'idée que le système immunitaire peut influencer la progression tumorale tôt dans le développement de la maladie.

Pour ce faire, nous allons combiner une approche génétique utilisant la technologie de séquençage à haut débit pour identifier des antigènes tumoraux avec une approche immunologique pour déterminer leur immunogénicité. Pour un patient donné, nous comparerons la séquence de l'exome tumoral, à partir d'un fragment de la tumeur, avec celle de l'exome de lymphocytes sanguins du patient pour recenser les mutations somatiques tumorales (principalement mutations ponctuelles, mais aussi réarrangements) susceptibles de générer des peptides antigéniques reconnaissables par des lymphocytes T. Ces peptides candidats seront synthétisés. Parallèlement nous tenterons d'obtenir plus de 100 clones lymphocytaires T CD8 indépendants à partir de lymphocytes infiltrant la tumeur, puis testerons l'ensemble de ces clones pour leur capacité à reconnaître chacun des peptides candidats chargés sur des cellules présentatrices autologues. Sur base des données récentes concernant l'incidence de mutations entraînant l'expression de protéines modifiées au sein de diverses

tumeurs ^(27,199), nous estimons devoir tester une centaine de peptides pour une tumeur donnée. Si des lymphocytes T spécifiques d'un des antigènes sélectionnés sont identifiés, leur fréquence dans la tumeur pourra être déterminée en évaluant la prévalence de leur TCR dans la diversité du répertoire analysé dans la tumeur.

Si la preuve est faite que l'instabilité génétique d'une tumeur humaine est une source d'antigènes tumoraux spécifiques reconnus par le système immunitaire, cela pourrait ouvrir de nouvelles pistes d'immunothérapie ciblée et personnalisée, les progrès technologiques du séquençage à haut débit de l'ADN laissant espérer dans un futur proche l'accès au génome tumoral complet chez chacun de nos patients.

Références bibliographiques

1. Burnet FM. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1–27.
2. Burnet FM. 1971. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 7:3–25.
3. Stutman O. 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183(4124):534–536.
4. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, and Schreiber RD. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832):1107–11.
5. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, and Schreiber RD. 1998. Demonstration of an Interferon γ -Dependent Tumor Surveillance System in Immunocompetent Mice. *Proc Natl Acad Sci* 95(13):7556–7561.
6. Noguchi Y, Jungbluth A, Richards EC, and Old LJ. 1996. Effect of Interleukin 12 on Tumor Induction by 3-Methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci* 93(21):11798–11801.
7. Maryanski JL, Marchand M, Uyttenhove C, and Boon T. 1983. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. VI. Occasional escape from host rejection due to antigen-loss secondary variants. *Int. J. Cancer* 31(1):119–123.
8. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, and Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 3(11):991—998.

9. Willimsky G and Blankenstein T. 2005. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437(7055):141–146.
10. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, and Vajdic CM. 2007. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet* 370(9581):59–67.
11. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, et al. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348(3):203–13.
12. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, and Cascinelli N. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77(7):1303–1310.
13. Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, and Schlag PM. 2001. Prognostic Significance of Activated CD8+ T Cell Infiltrations Within Esophageal Carcinomas. *Cancer Res* 61(10):3932–3936.
14. Kärjä V, Aaltomaa S, Lipponen P, Isotalo T, Talja M, and Mokka R. 2005. Tumour-Infiltrating Lymphocytes: A Prognostic Factor of PSA-Free Survival in Patients with Local Prostate Carcinoma Treated by Radical Prostatectomy. *Anticancer Res* 25(6C):4435–4438.
15. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, Ellis IO, and Green AR. 2011. Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol* 29(15):1949–1955.

16. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, et al. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313(5795):1960–4.
17. Edge S., Byrd D., Compton C., Fritz A., Greene F., and Trotti A. 2010. *AJCC Cancer Staging Manual*. Springer.
18. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. 2002. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science* 298(5594):850–854.
19. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, et al. 2005. Adoptive Cell Transfer Therapy Following Non-Myeloablative but Lymphodepleting Chemotherapy for the Treatment of Patients With Refractory Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol* 23(10):2346–2357.
20. Yeh S, Karne NK, Kerkar SP, Heller CK, Palmer DC, Johnson LA, Li Z, et al. 2009. Ocular and Systemic Autoimmunity after Successful Tumor-Infiltrating Lymphocyte Immunotherapy for Recurrent, Metastatic Melanoma. *Ophthalmology* 116(5):981–989.e1.
21. Dhodapkar MV, Krasovsky J, Osman K, and Geller MD. 2003. Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med* 198(11):1753—1757.
22. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, and Boon T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254(5038):1643–7.

23. Van Der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van den Eynde BJ, Brasseur F, and Boon T. 2002. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunological Reviews* 188(1):51–64.
24. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, and Old LJ. 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer* 5(8):615–625.
25. De Plaen E, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora J-P, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, et al. 1994. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40(5):360–369.
26. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, and Boon T. 1996. The Activation of Human Gene MAGE-1 in Tumor Cells Is Correlated with Genome-Wide Demethylation. *Proc Natl Acad Sci* 93(14):7149–7153.
27. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, Varela I, et al. 2010. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 463(7278):191–196.
28. Baurain JF, Colau D, van Baren N, Landry C, Martelange V, Vikkula M, Boon T, and Coulie PG. 2000. High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J. Immunol.* 164(11):6057–6066.
29. Karanikas V, Colau D, Baurain JF, Chiari R, Thonnard J, Gutierrez-Roelens I, Goffinet C, et al. 2001. High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against

- a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. *Cancer Res.* 61(9):3718–3724.
30. Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, Wölfel C, Huber C, and Wölfel T. 2005. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(44):16013–16018.
 31. Filaci G, Fravega M, Setti M, Traverso P, Millo E, Fenoglio D, Negrini S, et al. 2006. Frequency of telomerase-specific CD8⁺ T lymphocytes in patients with cancer. *Blood* 107(4):1505–12.
 32. Godet Y, Fabre-Guillevin E, Dosset M, Lamuraglia M, Levionnois E, Ravel P, Benhamouda N, et al. 2012. Analysis of Spontaneous Tumor-Specific CD4 T Cell Immunity in Lung Cancer Using Promiscuous HLA-DR Telomerase-Derived Epitopes: Potential Synergistic Effect with Chemotherapy Response. *Clin Cancer Res*: 18(10):2943-53
 33. Gannagé M, Abel M, Michallet A-S, Delluc S, Lambert M, Giraudier S, Kratzer R, et al. 2005. Ex Vivo Characterization of Multiepitopic Tumor-Specific CD8 T Cells in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Implications for Vaccine Development and Adoptive Cellular Immunotherapy. *J Immunol* 174(12):8210–8218.
 34. Sotiropoulou PA, Perez SA, Voelter V, Echner H, Missitzis I, Tsavaris NB, Papamichail M, and Baxevanis CN. 2003. Natural CD8⁺ T-cell responses against MHC class I epitopes of the HER-2/ neu oncoprotein in patients with epithelial tumors. *Cancer Immunol Immunother* 52(12):771–9.

35. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Zeng G, Dudley M, and Rosenberg SA. 2002. Multiple HLA Class II-Restricted Melanocyte Differentiation Antigens Are Recognized by Tumor-Infiltrating Lymphocytes from a Patient with Melanoma. *J Immunol* 169(10):6036–6047.
36. Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, Li YF, Southwood S, Sette A, Rosenberg SA, and Robbins PF. 1996. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J. Exp. Med.* 183(5):1965–1971.
37. Romero P, Valmori D, Pittet MJ, Zippelius A, Rimoldi D, Lévy F, Dutoit V, et al. 2002. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol. Rev.* 188:81–96.
38. Yee C, Thompson JA, Roche P, Byrd DR, Lee PP, Piepkorn M, Kenyon K, Davis MM, Riddell SR, and Greenberg PD. 2000. Melanocyte Destruction After Antigen-Specific Immunotherapy of Melanoma Direct Evidence of T Cell–Mediated Vitiligo. *J Exp Med* 192(11):1637–1644.
39. Overwijk WW and Restifo NP. 2000. Autoimmunity and the Immunotherapy of Cancer: Targeting the “Self” to Destroy the “Other.” *Crit Rev Immunol* 20(6):433–450.
40. Boon T and Van Pel A. 1978. Teratocarcinoma cell variants rejected by syngeneic mice: protection of mice immunized with these variants against other variants and against the original malignant cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(3):1519–1523.

41. Van Pel A, Georlette M, and Boon T. 1979. Tumor cell variants obtained by mutagenesis of a Lewis lung carcinoma cell line: immune rejection by syngeneic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(10):5282–5285.
42. Van Pel A, Vessière F, and Boon T. 1983. Protection against two spontaneous mouse leukemias conferred by immunogenic variants obtained by mutagenesis. *J. Exp. Med.* 157(6):1992–2001.
43. Boon T and Maryanski J. 1985. Tumour cell variants with increased immunogenicity obtained by mutagen treatment. *Cancer Surv.* 4(1):135–148.
44. Elliott GT, McLeod RA, Perez J, and Von Eschen KB. 1993. Interim results of a phase II multicenter clinical trial evaluating the activity of a therapeutic allogeneic melanoma vaccine (theraccine) in the treatment of disseminated malignant melanoma. *Semin Surg Oncol* 9(3):264–272.
45. Sondak VK, Liu P-Y, Tuthill RJ, Kempf RA, Unger JM, Sosman JA, Thompson JA, et al. 2002. Adjuvant Immunotherapy of Resected, Intermediate-Thickness, Node-Negative Melanoma With an Allogeneic Tumor Vaccine: Overall Results of a Randomized Trial of the Southwest Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 20(8):2058–2066.
46. Mitchell MS, Abrams J, Thompson JA, Kashani-Sabet M, DeConti RC, Hwu W-J, Atkins MB, et al. 2007. Randomized Trial of an Allogeneic Melanoma Lysate Vaccine With Low-Dose Interferon Alfa-2b Compared With High-Dose Interferon Alfa-2b for Resected Stage III Cutaneous Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 25(15):2078–2085.

47. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, et al. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 363(5):411–422.
48. Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dréno B, Tessier MH, Rankin E, et al. 1999. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int. J. Cancer* 80(2):219–230.
49. Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, et al. 1999. Vaccination with Mage-3a1 Peptide–Pulsed Mature, Monocyte-Derived Dendritic Cells Expands Specific Cytotoxic T Cells and Induces Regression of Some Metastases in Advanced Stage IV Melanoma. *J Exp Med* 190(11):1669–1678.
50. Van Baren N, Bonnet M-C, Dréno B, Khammari A, Dorval T, Piperno-Neumann S, Liénard D, et al. 2005. Tumoral and Immunologic Response After Vaccination of Melanoma Patients With an ALVAC Virus Encoding MAGE Antigens Recognized by T Cells. *J. Clin. Oncol.* 23(35):9008–9021.
51. World Health Organization. 1979. *WHO handbook for reporting results of cancer treatment*. Geneva; Albany, N.Y.: World Health Organization; sold by WHO Publications Centre USA].
52. Hoos A, Eggermont AMM, Janetzki S, Hodi FS, Ibrahim R, Anderson A, Humphrey R, Blumenstein B, Old L, and Wolchok J. 2010. Improved Endpoints for Cancer Immunotherapy Trials. *J Natl Cancer Inst* 102(18):1388–1397.

53. Herr W, Schneider J, Lohse AW, Meyer zum Büschenfelde KH, and Wölfel T. 1996. Detection and quantification of blood-derived CD8⁺ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *J. Immunol. Methods* 191(2):131–142.
54. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JL, McMichael AJ, and Davis MM. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274(5284):94–96.
55. Coulie PG, Karanikas V, Lurquin C, Colau D, Connerotte T, Hanagiri T, Van Pel A, et al. 2002. Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunological Reviews* 188(1):33–42.
56. Lurquin C, Lethé B, De Plaen E, Corbière V, Théate I, van Baren N, Coulie PG, and Boon T. 2005. Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J Exp Med* 201(2):249–57.
57. Carrasco J, Van Pel A, Neyns B, Lethé B, Brasseur F, Renkvist N, van der Bruggen P, et al. 2008. Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells. *J Immunol* 180(5):3585–93.
58. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, and Galon J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* 12(4):298–306.

59. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, et al. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353(25):2654–66.
60. Oldford SA, Robb JD, Codner D, Gadag V, Watson PH, and Drover S. 2006. Tumor Cell Expression of HLA-DM Associates with a Th1 Profile and Predicts Improved Survival in Breast Carcinoma Patients. *Int. Immunol.* 18(11):1591–1602.
61. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, et al. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* 10(9):942–949.
62. Grabenbauer GG. 2006. Tumor-Infiltrating Cytotoxic T Cells but not Regulatory T Cells Predict Outcome in Anal Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 12(11):3355–3360.
63. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, and Banham AH. 2006. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 108(9):2957–2964.
64. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, and Iacopetta B. 2009. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 27(2):186–192.
65. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EIH, Huizinga TWJ, and Toes REM. 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 37(1):129–138.

66. de Vries IJM, Castelli C, Huygens C, Jacobs JFM, Stockis J, Schuler-Thurner B, Adema GJ, et al. 2010. Frequency of Circulating Tregs with Demethylated FOXP3 Intron 1 in Melanoma Patients Receiving Tumor Vaccines and Potentially Treg-Depleting Agents. *Clinical Cancer Research* 17(4):841–848.
67. Moss P and Khan N. 2004. CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum. Immunol.* 65(5):456–464.
68. Halwani R, Doroudchi M, Yassine-Diab B, Janbazian L, Shi Y, Said E, Haddad E, and Sékaly R-P. 2006. Generation and maintenance of human memory cells during viral infection. *Springer Seminars in Immunopathology* 28(3):197–208.
69. Thomas ML and Lefrançois L. 1988. Differential expression of the leucocyte-common antigen family. *Immunol. Today* 9(10):320–326.
70. Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, and Beverley PCL. 2001. A Deletion in the Gene Encoding the CD45 Antigen in a Patient with SCID. *J Immunol* 166(2):1308–1313.
71. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, Kündig TM, Kawai K, Wakeham A, Timms E, Pfeffer K, Ohashi PS, and Thomas ML. 1993. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 74(1):143–156.
72. Koretzky GA, Picus J, Thomas ML, and Weiss A. 1990. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature* 346(6279):66–68.

73. Hermiston ML, Xu Z, and Weiss A. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:107–137.
74. Hermiston ML, Xu Z, Majeti R, and Weiss A. 2002. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *Journal of Clinical Investigation* 109(1):9–14.
75. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, and Lipp M. 1999. CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell* 99(1):23–33.
76. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410(6824):50–56.
77. Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Ojima Y, Nakamura K, Hongo A, and Hiramatsu Y. 2007. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Ann. Oncol.* 18(1):70–76.
78. Tedder TF, Steeber DA, and Pizcueta P. 1995. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J. Exp. Med.* 181(6):2259–2264.
79. Zarbock A, Ley K, McEver RP, and Hidalgo A. 2011. Leukocyte Ligands for Endothelial Selectins: Specialized Glycoconjugates That Mediate Rolling and Signaling Under Flow. *Blood* 118(26):6743–6751.

80. van Lier RA, Borst J, Vroom TM, Klein H, Van Mourik P, Zeijlemaker WP, and Melief CJ. 1987. Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen. *J. Immunol.* 139(5):1589–1596.
81. Croft M. 2009. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 9(4):271–285.
82. van Montfrans JM, Hoepelman AIM, Otto S, van Gijn M, van de Corput L, de Weger RA, Monaco-Shawver L, et al. 2012. CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129(3):787–793.e6.
83. Hendriks J, Gravestein LA, Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, and Borst J. 2000. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nature Immunology.* 1(5):433–440.
84. Tesselaar K, Arens R, Schijndel GMW van, Baars PA, Valk MA van der, Borst J, Oers MHJ van, and Lier RAW van. 2002. Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. *Nature Immunology* 4(1):49–54.
85. Mueller DL, Jenkins MK, and Schwartz RH. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7:445–480.
86. Linsley PS, Clark EA, and Ledbetter JA. 1990. T-Cell Antigen CD28 Mediates Adhesion with B Cells by Interacting with Activation Antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci* 87(13):5031–5035.

87. Sperling AI, Auger JA, Ehst BD, Rulifson IC, Thompson CB, and Bluestone JA. 1996. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J. Immunol.* 157(9):3909–3917.
88. Sharpe AH and Freeman GJ. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2(2):116–126.
89. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, and Bluestone JA. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1(5):405–413.
90. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Fusilli S, Zendoli F, and Carotenuto M. 1998. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica* 83(3):197–203.
91. de Jong R, Brouwer M, Miedema F, and van Lier RA. 1991. Human CD8⁺ T lymphocytes can be divided into CD45RA⁺ and CD45RO⁺ cells with different requirements for activation and differentiation. *J. Immunol.* 146(7):2088–2094.
92. Clement LT. 1992. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J. Clin. Immunol.* 12(1):1–10.
93. Okumura M, Fujii Y, Inada K, Nakahara K, and Matsuda H. 1993. Both CD45RA⁺ and CD45RA⁻ subpopulations of CD8⁺ T cells contain cells with high levels of lymphocyte function-associated antigen-1 expression, a phenotype of primed T cells. *J. Immunol.* 150(2):429–437.
94. Dustin ML and Springer TA. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341(6243):619–624.

95. Ito M, Watanabe M, Kamiya H, and Sakurai M. 1995. Changes of adhesion molecule (LFA-1, ICAM-1) expression on memory T cells activated with cytomegalovirus antigen. *Cell. Immunol.* 160(1):8–13.
96. Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, Brouwer M, Baars P, and van Lier RA. 1993. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J. Immunol.* 151(5):2426–2435.
97. Hamann D, Baars PA, Rep MHG, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, and Lier RAWV. 1997. Phenotypic and Functional Separation of Memory and Effector Human CD8⁺ T Cells. *J Exp Med* 186(9):1407–1418.
98. Sallusto F, Lenig D, F[ouml]rster R, Lipp M, and Lanzavecchia A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 402:34–38.
99. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, et al. 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410(6824):106–111.
100. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, Ogg GS, et al. 2002. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine* 8(4):379–385.
101. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, and Roederer M. 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 73(11):975–983.

102. Tierney RJ, Steven N, Young LS, and Rickinson AB. 1994. Epstein-Barr Virus Latency in Blood Mononuclear Cells: Analysis of Viral Gene Transcription During Primary Infection and in the Carrier State. *J. Virol.* 68(11):7374–7385.
103. Hislop AD, Annels NE, Gudgeon NH, Leese AM, and Rickinson AB. 2002. Epitope-Specific Evolution of Human CD8+ T Cell Responses from Primary to Persistent Phases of Epstein-Barr Virus Infection. *J Exp Med* 195(7):893–905.
104. Mortarini R, Piris A, Maurichi A, Molla A, Bersani I, Bono A, Bartoli C, et al. 2003. Lack of Terminally Differentiated Tumor-Specific CD8+ T Cells at Tumor Site in Spite of Antitumor Immunity to Self-Antigens in Human Metastatic Melanoma. *Cancer Res* 63(10):2535–2545.
105. Walker EB, Haley D, Miller W, Floyd K, Wisner KP, Sanjuan N, Maecker H, et al. 2004. Gp100209–2M Peptide Immunization of Human Lymphocyte Antigen-A2+ Stage I-III Melanoma Patients Induces Significant Increase in Antigen-Specific Effector and Long-Term Memory CD8+ T Cells. *Clin Cancer Res* 10(2):668–680.
106. Di Pucchio T, Pilla L, Capone I, Ferrantini M, Montefiore E, Urbani F, Patuzzo R, et al. 2006. Immunization of Stage IV Melanoma Patients with Melan-A/MART-1 and Gp100 Peptides Plus IFN- α Results in the Activation of Specific CD8+ T Cells and Monocyte/Dendritic Cell Precursors. *Cancer Res* 66(9):4943–4951.
107. Schaefer C, Butterfield LH, Lee S, Kim GG, Visus C, Albers A, Kirkwood JM, and Whiteside TL. 2012. Function but not phenotype of melanoma peptide-specific CD8+ T cells correlate with survival in a multiepitope peptide vaccine trial (ECOG 1696). *International Journal of Cancer* 131(4):874–884.

108. Boon T and Van den Eynde B. 2000. Cancer vaccines: Cancer antigens, shared tumor-specific antigens. In *Principles and Practice of the Biologic Therapy of Cancer.*, p. 493. Lippincott Williams & Wilkins.
109. Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethé B, Brasseur F, and Boon T. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179(3):921–930.
110. Schultz ES, Zhang Y, Knowles R, Tine J, Traversari C, Boon T, and van der Bruggen P. 2001. A MAGE-3 peptide recognized on HLA-B35 and HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 57(2):103–109.
111. Coulie PG, Karanikas V, Colau D, Lurquin C, Landry C, Marchand M, Dorval T, Brichard V, and Boon T. 2001. A Monoclonal Cytolytic T-Lymphocyte Response Observed in a Melanoma Patient Vaccinated with a Tumor-Specific Antigenic Peptide Encoded by Gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci* 98(18):10290–10295.
112. Karanikas V, Lurquin C, Colau D, Baren NV, Smet CD, Lethé B, Connerotte T, et al. 2003. Monoclonal Anti-MAGE-3 CTL Responses in Melanoma Patients Displaying Tumor Regression After Vaccination with a Recombinant Canarypox Virus. *J Immunol* 171(9):4898–4904.
113. Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271–296.
114. Boon T, Van Snick J, Van Pel A, Uyttenhove C, and Marchand M. 1980. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. II. T lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 152(5):1184–1193.

115. Genevée C, Diu A, Nierat J, Caignard A, Dietrich PY, Ferradini L, Roman-Roman S, Triebel F, and Hercend T. 1992. An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V alpha 1-w29/V beta 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol.* 22(5):1261–1269.
116. Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zöller M, and Kourilsky P. 1993. The Sizes of the CDR3 Hypervariable Regions of the Murine T-Cell Receptor Beta Chains Vary as a Function of the Recombined Germ-Line Segments. *Proc Natl Acad Sci* 90(9):4319–4323.
117. Chaux P, Vantomme V, Coulie P, Boon T, and van der Bruggen P. 1998. Estimation of the frequencies of anti-MAGE-3 cytolytic T-lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer. *International Journal of Cancer* 77(4):538–542.
118. Lonchay C, van der Bruggen P, Connerotte T, Hanagiri T, Coulie P, Colau D, Lucas S, et al. 2004. Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14631–8.
119. Godelaine D, Carrasco J, Brasseur F, Neyns B, Thielemans K, Boon T, and Van Pel A. 2007. A new tumor-specific antigen encoded by MAGE-C2 and presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B44. *Cancer Immunol Immunother* 56(6):753–9.
120. Gajewski TF, Fallarino F, Ashikari A, and Sherman M. 2001. Immunization of HLA-A2+ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed

autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12. *Clin. Cancer Res.* 7(3 Suppl):895s–901s.

121. Cebon J, Jäger E, Shackleton MJ, Gibbs P, Davis ID, Hopkins W, Gibbs S, et al. 2003. Two phase I studies of low dose recombinant human IL-12 with Melan-A and influenza peptides in subjects with advanced malignant melanoma. *Cancer Immun.* 3:7.
122. Slingluff CL, Petroni GR, Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, et al. 2003. Clinical and Immunologic Results of a Randomized Phase II Trial of Vaccination Using Four Melanoma Peptides Either Administered in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Adjuvant or Pulsed on Dendritic Cells. *J. Clin. Oncol.* 21(21):4016–4026.
123. Slingluff CL, Petroni GR, Yamshchikov GV, Hibbitts S, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Bissonette EA, et al. 2004. Immunologic and Clinical Outcomes of Vaccination With a Multiepitope Melanoma Peptide Vaccine Plus Low-Dose Interleukin-2 Administered Either Concurrently or on a Delayed Schedule. *J. Clin. Oncol.* 22(22):4474–4485.
124. Mitchell MS, Harel W, Kempf RA, Hu E, Kan-Mitchell J, Boswell WD, Dean G, and Stevenson L. 1990. Active-specific immunotherapy for melanoma. *J. Clin. Oncol.* 8(5):856–869.
125. Marchand M, Punt CJA, Aamdal S, Escudier B, Kruit WHJ, Keilholz U, Håkansson L, et al. 2003. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. *Eur. J. Cancer* 39(1):70–77.

126. Kruit WHJ, van Ojik HH, Brichard VG, Escudier B, Dorval T, Dréno B, Patel P, et al. 2005. Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 117(4):596–604.
127. Godelaine D, Carrasco J, Lucas S, Karanikas V, Schuler-Thurner B, Coulie PG, Schuler G, Boon T, and Van Pel A. 2003. Polyclonal CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a MAGE-3.A1 peptide. *J Immunol* 171(9):4893–7.
128. Germeau C, Ma W, Schiavetti F, Lurquin C, Henry E, Vigneron N, Brasseur F, et al. 2005. High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J Exp Med* 201(2):241–8.
129. Tuyaerts S, Noppe SM, Corthals J, Breckpot K, Heirman C, De Greef C, Van Riet I, and Thielemans K. 2002. Generation of large numbers of dendritic cells in a closed system using Cell Factories. *J. Immunol. Methods* 264(1-2):135–151.
130. Schultz ES, Lethé B, Cambiaso CL, Snick JV, Chaux P, Corthals J, Heirman C, Thielemans K, Boon T, and Bruggen P van der. 2000. A MAGE-A3 Peptide Presented by HLA-DP4 Is Recognized on Tumor Cells by CD4+ Cytolytic T Lymphocytes. *Cancer Res* 60(22):6272–6275.
131. Brasseur F. 2002. Melanoma: Brussels Melanoma Cell Lines. In *Human Cell Culture*, ed. JRW Masters, B Palsson, 1: 275–282. Springer Netherlands.
132. Lucas S, De Plaen E, and Boon T. 2000. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int. J. Cancer* 87(1):55–60.

133. Lethé B, Lucas S, Michaux L, De Smet C, Godelaine D, Serrano A, De Plaen E, and Boon T. 1998. LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer* 76(6):903–908.
134. Guilloux Y, Lucas S, Brichard VG, Van Pel A, Viret C, De Plaen E, Brasseur F, Lethé B, Jotereau F, and Boon T. 1996. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med.* 183(3):1173–1183.
135. Brichard VG, Herman J, Van Pel A, Wildmann C, Gaugler B, Wölfel T, Boon T, and Lethé B. 1996. A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26(1):224–230.
136. Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, Lethé B, Carrel S, Arienti F, Suter L, Vanwijck R, Bourlond A, and Humblet Y. 1995. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* 63(3):375–380.
137. Jäger E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jäger D, Ilseemann C, Hagedorn M, Oesch F, and Knuth A. 1996. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int. J. Cancer* 67(1):54–62.
138. Zhang Y, Renkvist N, Sun Z, Schuler-Thurner B, Glaichenhaus N, Schuler G, Boon T, van der Bruggen P, and Colau D. 2005. A polyclonal anti-vaccine CD4 T cell response detected with HLA-DP4 multimers in a melanoma patient vaccinated with MAGE-3.DP4-peptide-pulsed dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 35(4):1066–1075.

139. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, and van der Bruggen P. 2006. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175–208.
140. McRae BL, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, and Miller SD. 1995. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 182(1):75–85.
141. Markiewicz MA, Fallarino F, Ashikari A, and Gajewski TF. 2001. Epitope spreading upon P815 tumor rejection triggered by vaccination with the single class I MHC-restricted peptide P1A. *Int. Immunol.* 13(5):625–632.
142. Lally KM, Mocellin S, Ohnmacht GA, Nielsen MB, Bettinotti M, Panelli MC, Monsurro V, and Marincola FM. 2001. Unmasking cryptic epitopes after loss of immunodominant tumor antigen expression through epitope spreading. *Int. J. Cancer* 93(6):841–847.
143. Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Amarnani SN, Vu HT, Oseguera D, Wang H-J, et al. 2003. Determinant Spreading Associated with Clinical Response in Dendritic Cell-based Immunotherapy for Malignant Melanoma. *Clin Cancer Res* 9(3):998–1008.
144. Ribas A, Timmerman JM, Butterfield LH, and Economou JS. 2003. Determinant spreading and tumor responses after peptide-based cancer immunotherapy. *Trends in Immunology* 24(2):58–61.
145. Vignard V, Lemerrier B, Lim A, Pandolfino M-C, Guilloux Y, Khammari A, Rabu C, et al. 2005. Adoptive Transfer of Tumor-Reactive Melan-A-Specific CTL Clones in Melanoma Patients Is Followed by Increased Frequencies of Additional Melan-A-Specific T Cells. *J Immunol* 175(7):4797–4805.

146. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, and Seipp CA. 1988. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 319(25):1676–1680.
147. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J, and Harlin H. 2006. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunological Reviews* 213(1):131–145.
148. Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, Förster R, Lipp M, and Lanzavecchia A. 1999. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 29(6):2037–2045.
149. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, and Cyster JG. 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci* 97(23):12694–12699.
150. Beverley PC. 1992. Functional analysis of human T cell subsets defined by CD45 isoform expression. *Semin. Immunol.* 4(1):35–41.
151. Michie CA, McLean A, Alcock C, and Beverley PCL. 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. , *Published online: 19 November 1992; | doi:10.1038/360264a0* 360(6401):264–265.
152. Wills MR, Carmichael AJ, Weekes MP, Mynard K, Okecha G, Hicks R, and Sissons JGP. 1999. Human Virus-Specific CD8⁺ CTL Clones Revert from CD45RO^{high} to CD45RA^{high} In Vivo: CD45RA^{high}CD8⁺ T Cells Comprise Both Naive and Memory Cells. *J Immunol* 162(12):7080–7087.

153. Lanzavecchia A and Sallusto F. 2000. Dynamics of T Lymphocyte Responses: Intermediates, Effectors, and Memory Cells. *Science* 290(5489):92–97.
154. Geginat J, Lanzavecchia A, and Sallusto F. 2003. Proliferation and Differentiation Potential of Human CD8⁺ Memory T-Cell Subsets in Response to Antigen or Homeostatic Cytokines. *Blood* 101(11):4260–4266.
155. Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, Cerottini J-C, et al. 2003. Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood* 102(5):1779–1787.
156. Leeuwen EM van, Gamadia LE, Baars PA, Remmerswaal EB, Berge IJ ten, and Lier RA van. 2002. Proliferation Requirements of Cytomegalovirus-Specific, Effector-Type Human CD8⁺ T Cells. *J Immunol* 169(10):5838–5843.
157. Dunne PJ, Faint JM, Gudgeon NH, Fletcher JM, Plunkett FJ, Soares MVD, Hislop AD, et al. 2002. Epstein-Barr Virus-Specific CD8⁺ T Cells That Re-Express CD45RA Are Apoptosis-Resistant Memory Cells That Retain Replicative Potential. *Blood* 100(3):933–940.
158. Sallusto F, Geginat J, and Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22:745–763.
159. Van Leeuwen EMM, Van Buul JD, Remmerswaal EBM, Hordijk PL, Ten Berge IJM, and Van Lier RAW. 2005. Functional Re-Expression of CCR7 on CMV-Specific CD8⁺ T Cells Upon Antigenic Stimulation. *Int. Immunol.* 17(6):713–719.

160. Schwendemann J, Choi C, Schirmmacher V, and Beckhove P. 2005. Dynamic Differentiation of Activated Human Peripheral Blood CD8⁺ and CD4⁺ Effector Memory T Cells. *J Immunol* 175(3):1433–1439.
161. Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, and van der Bruggen P. 2006. A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55(7):867–872.
162. Liu K, Catalfamo M, Li Y, Henkart PA, and Weng N. 2002. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8⁺ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci* 99(9):6192–6197.
163. Dunne PJ, Belaramani L, Fletcher JM, Mattos D, Fernandez S, Lawrenz M, Soares MVD, et al. 2005. Quiescence and Functional Reprogramming of Epstein-Barr Virus (EBV)–Specific CD8⁺ T Cells During Persistent Infection. *Blood* 106(2):558–565.
164. Anichini A, Scarito A, Molla A, Parmiani G, and Mortarini R. 2003. Differentiation of CD8⁺ T Cells from Tumor-Invaded and Tumor-Free Lymph Nodes of Melanoma Patients: Role of Common γ -Chain Cytokines. *J Immunol* 171(4):2134–2141.
165. Atanackovic D, Block A, Weerth A de, Faltz C, Hossfeld DK, and Hegewisch-Becker S. 2004. Characterization of Effusion-Infiltrating T Cells Benign versus Malignant Effusions. *Clin Cancer Res* 10(8):2600–2608.
166. Jäger E, Höhn H, Necker A, Förster R, Karbach J, Freitag K, Neukirch C, et al. 2002. Peptide-specific CD8⁺ T-cell evolution in vivo: Response to peptide

- vaccination with Melan-A/MART-1. *International Journal of Cancer* 98(3):376–388.
167. Corbière V, Chapiro J, Stroobant V, Ma W, Lurquin C, Lethé B, van Baren N, Van den Eynde BJ, Boon T, and Coulie PG. 2011. Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases. *Cancer Res.* 71(4):1253–1262.
 168. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, et al. 1999. High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.* 17(7):2105–2105.
 169. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M.D. JW, Garbe C, Lebbe C, et al. 2011. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med* 364(26):2517–2526.
 170. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, et al. 2012. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366(26):2455–2465.
 171. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, et al. 2012. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366(26):2443–2454.
 172. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, et al. 2010. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol* 28(1):105–113.

173. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, Pommerenke T, et al. 2011. Localization and Density of Immune Cells in the Invasive Margin of Human Colorectal Cancer Liver Metastases Are Prognostic for Response to Chemotherapy. *Cancer Res* 71(17):5670–5677.
174. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, and Kroemer G. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8(1):59—73.
175. Berd D, Maguire HC, and Mastrangelo MJ. 1984. Potentiation of Human Cell-Mediated and Humoral Immunity by Low-Dose Cyclophosphamide. *Cancer Res* 44(11):5439–5443.
176. Machiels J-PH, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI, and Jaffee EM. 2001. Cyclophosphamide, Doxorubicin, and Paclitaxel Enhance the Antitumor Immune Response of Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor-Secreting Whole-Cell Vaccines in HER-2/Neu Tolerized Mice. *Cancer Res* 61(9):3689–3697.
177. Lutsiak MEC, Semnani RT, Pascalis RD, Kashmiri SVS, Schlom J, and Sabzevari H. 2005. Inhibition of CD4+25+ T Regulatory Cell Function Implicated in Enhanced Immune Response by Low-Dose Cyclophosphamide. *Blood* 105(7):2862–2868.
178. Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, Pequignot M, et al. 2006. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med JT - Nature medicine*. 12(2):214—219.

179. Mohty M, Jourdan E, Mami NB, Vey N, Damaj G, Blaise D, Isnardon D, Olive D, and Gaugler B. 2004. Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 103(12):4666–4668.
180. Rosa SCD, Herzenberg LA, Herzenberg LA, and Roederer M. 2001. 11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature Medicine* 7(2):245–248.
181. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, et al. 2011. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*. 17(10):1290–1297.
182. Kaech SM and Ahmed R. 2001. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nature Immunology* 2(5):415–422.
183. Lanzavecchia A and Sallusto F. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 17(3):326–332.
184. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, and Ahmed R. 2002. Molecular and Functional Profiling of Memory CD8 T Cell Differentiation. *Cell* 111(6):837–851.
185. Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, von Andrian UH, and Ahmed R. 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology* 4(3):225–234.
186. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, Murali-Krishna K, et al. 2008. Human effector and memory CD8⁺ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 28(5):710–22.

187. Carrasco J, Godelaine D, Van Pel A, Boon T, and van der Bruggen P. 2006. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. *Blood* 108(9):2897–905.
188. Wherry EJ. 2011. T cell exhaustion. *Nature Immunology*. 12(6):492–499.
189. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, Miller JD, Araki K, Doho GH, Tata P, et al. 2011. Phenotype, Function, and Gene Expression Profiles of Programmed Death-1hi CD8 T Cells in Healthy Human Adults. *J Immunol* 186(7):4200–4212.
190. Kestens L, Vanham G, Gigase P, Young G, Hannet I, Vanlangendonck F, Hulstaert F, and Bach BA. 1992. Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS* 6(8):793–797.
191. Lécureux C, Girault I, Urrutia A, Doisne J-M, Deveau C, Goujard C, Meyer L, Sinet M, and Venet A. 2009. Identification of a particular HIV-specific CD8+ T-cell subset with a CD27+ CD45RO–/RA+ phenotype and memory characteristics after initiation of HAART during acute primary HIV infection. *Blood* 113(14):3209–3217.
192. Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJG, and Carmichael AJ. 2002. Identification of Naive or Antigen-Experienced Human CD8+ T Cells by Expression of Costimulation and Chemokine Receptors: Analysis of the Human Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cell Response. *J Immunol* 168(11):5455–5464.
193. Lilleri D, Fornara C, Revello MG, and Gerna G. 2008. Human Cytomegalovirus-Specific Memory CD8+ and CD4+ T Cell Differentiation After Primary Infection. *J Infect Dis*. 198(4):536–543.

194. Waller ECP, McKinney N, Hicks R, Carmichael AJ, Sissons JGP, and Wills MR. 2007. Differential Costimulation Through CD137 (4-1BB) Restores Proliferation of Human Virus-Specific “effector Memory” (CD28– CD45RAHI) CD8+ T Cells. *Blood* 110(13):4360–4366.
195. Dunbar PR, Smith CL, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, Lipp M, et al. 2000. A Shift in the Phenotype of Melan-A-Specific CTL Identifies Melanoma Patients with an Active Tumor-Specific Immune Response. *J Immunol* 165(11):6644–6652.
196. Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemissen AM, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, et al. 2002. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res* 62(6):1743–50.
197. Maczek C, Berger TG, Schuler-Thurner B, Schultz ES, Hamann A, Dunbar PR, Cerundolo V, Steinkasserer A, and Schuler G. 2005. Differences in phenotype and function between spontaneously occurring melan-A-, tyrosinase- and influenza matrix peptide-specific CTL in HLA-A*0201 melanoma patients. *International Journal of Cancer* 115(3):450–455.
198. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, Gajewski TF, and Ascierto PA. 2012. The Immune Score as a New Possible Approach for the Classification of Cancer. *Journal of Translational Medicine* 10(1):1.
199. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, et al. 2009. In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 27(35):5944–5951.

200. Stephens PJ, McBride DJ, Lin M-L, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, Stebbings LA, et al. 2009. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 462(7276):1005–1010.

Annexe

1. Article 4 : Identification d'un nouvel antigène codé par *MAGE-C2* et présenté à des lymphocytes T cytolytiques par les molécules HLA-B44

A new tumor-specific antigen encoded by *MAGE-C2* and presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B44

Danièle Godelaine · Javier Carrasco · Francis Brasseur ·
Bart Neyns · Kris Thielemans · Thierry Boon ·
Aline Van Pel

Received: 22 February 2006 / Accepted: 27 May 2006 / Published online: 10 November 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract A panel of cytolytic T lymphocyte (CTL) clones was isolated from metastases and blood samples of a melanoma patient vaccinated with MAGE-3.A1-pulsed autologous dendritic cells. We report here the identification of a new antigen encoded by the *MAGE-C2* cancer-germline gene. This antigen is recognized by some of these CTL on HLA-B*4403. The sequence of the peptide is SESIKKKVL. It is processed in various melanoma cell lines expressing *MAGE-C2* and *HLA-B*4403*. Because of the expression pattern of gene *MAGE-C2*, this new antigen is strictly tumor-specific and could therefore be used for peptide-based antitumoral vaccination.

Keywords Antigenic peptide · Cancer immunotherapy · Cytolytic T lymphocytes · MAGE · Melanoma

Introduction

Among antigens recognized on tumors by autologous T lymphocytes [22], antigens encoded by cancer-germline genes, such as members of the *MAGE* gene family, represent an interesting category. These genes are expressed in tumors of various histological types but not in normal tissues except male germline cells [23]. Because germline cells do not express MHC molecules [9], they do not display antigenic peptides on their surface. Therefore peptides encoded by cancer-germline genes are strictly tumor-specific and of particular interest for cancer immunotherapy. Based on the use of defined antigens encoded by cancer-germline genes, various clinical trials of therapeutic vaccination have been initiated in melanoma patients. So far, less than 10% of patients have shown an objective clinical response, irrespective of the antigen or the vaccination modality used [2, 18].

Melanoma patient LB2586 received repeated injections of autologous mature dendritic cells pulsed with the MAGE-A3_{168–176} peptide presented by HLA-A1 for the treatment of multiple in transit skin metastases of the right lower leg. The patient displayed a mixed tumor response involving regression of most and progression of a limited number of cutaneous metastases. A monoclonal cytolytic T lymphocyte (CTL) response to the vaccine antigen was documented in the blood of the patient (J. Carrasco et al., manuscript in preparation). Tumor cell cultures were established from cutaneous metastases that were resected from this patient during the course of the therapeutic vaccination. These cells were used to stimulate autologous tumor infiltrating lymphocytes. Many CTL clones were obtained that lysed specifically the autologous melanoma cells but

D. Godelaine · J. Carrasco · F. Brasseur · T. Boon ·
A. Van Pel (✉)
Ludwig Institute for Cancer Research,
74 avenue Hippocrate, UCL 7459, 1200 Brussels, Belgium
e-mail: aline.vanpel@bru.lir.org

D. Godelaine · J. Carrasco · F. Brasseur · T. Boon · A. Van Pel
Institute of Cellular Pathology, Cellular Genetics Unit,
Université Catholique de Louvain, 74 avenue Hippocrate,
UCL 7459, 1200 Brussels, Belgium

B. Neyns
Department of Medical Oncology, Oncology Center,
AZ-VUB, 101 Laarbeeklaan, 1090 Brussels, Belgium

K. Thielemans
Laboratory of Physiology,
Vrije Universiteit Brussel Faculty of Medicine,
103 Laarbeeklaan, 1090 Brussels, Belgium

did not recognize the MAGE-3.A1 vaccine antigen. Some of these tumor-derived CTL clones were found to recognize a new antigen encoded by gene *MAGE-C2*, which is also recognized by CTL derived from the blood of this patient.

Materials and methods

Patient and cell lines

Melanoma patient LB2586 (HLA-A*0101, -A*2902, -B*27052, -B*4403, -Cw*0202, -Cw*1601) was vaccinated repeatedly with mature, monocyte-derived autologous dendritic cells pulsed with the HLA-A1-restricted MAGE-A3 peptide EVDPIGHLY_{168–176} [6] and the HLA-DP4-restricted MAGE-A3 peptide KKLLTQHFVQENYLEY_{243–258} [19]. The detailed vaccination schedule and the analysis of the response will be reported elsewhere (J. Carrasco et al., manuscript in preparation). Cultures of tumor cells were derived from two progressing cutaneous metastases, one resected after two cycles of six vaccinations and the other after two additional cycles. These cultures were established according to the procedure described by Brasseur [3]. Cultured melanoma cells were rapidly obtained in large numbers from the former metastasis, further referred to as LB2586-MEL.B, and could be easily propagated for several passages but a permanent line could not be established. Cultures from the other metastasis gave rise to melanoma line LB2586-MEL.G. Melanoma cells, EBV-transformed B cells and K562 cell line were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Invitrogen). COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 10% FCS. WEHI 164 clone 13 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 5% FCS. Media were supplemented with L-arginine (116 mg/l), L-asparagine (36 mg/l) and L-glutamine (216 mg/l). Lymphocytes were cultured in IMDM supplemented with 10% human serum (HS) and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol.

Anti-tumor CTL clones

Surgically resected progressing cutaneous metastases were used as a source of tumor infiltrating lymphocytes (TIL). A fresh tumor sample was chopped into small pieces that were distributed into wells in 1.5 ml of IMDM containing 1% autologous serum, recombinant human IL-2 (50 U/ml) (Chiron, Amsterdam, The

Netherlands), gentamycin (15 µg/ml) and nystatin (200 U/ml). After 14 days, the TIL were pooled in three groups of 4×10^5 lymphocytes and incubated with 2×10^5 irradiated (10,000 rads) LB2586-MEL.B tumor cells pretreated for 48 h with IFN-γ (100 U/ml) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), in 2 ml IMDM containing 10% HS, IL-2 (50 U/ml), IL-4 (1.5 ng/ml) (produced in our laboratory) and IL-7 (5 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Lymphocytes from the mixed lymphocyte tumor cultures (MLTC) were restimulated at days 7 and 14 in the same conditions. At day 20, they were cloned by limiting dilution in microwells containing irradiated LB2586-MEL.B tumor cells (5,000/well) pretreated with 100 U/ml IFN-γ for 48 h, irradiated allogenic LG2-EBV feeder cells (3×10^4 /well) and the cytokine cocktail. Restimulations were done at days 7 and 14 and a ^{51}Cr lysis assay was performed at day 20. CTL clones specific for the tumor were amplified in 2 ml cultures containing irradiated LB2586-MEL.B tumor cells pretreated with IFN-γ (2×10^5 /well) and irradiated LG2-EBV feeder cells (10^6 /well) in IMDM containing 10% HS and the cytokine cocktail. IFN-γ treatment of tumor cells upregulated the HLA expression and consistently increased the level of specific lysis in ^{51}Cr assay.

Blood CD8⁺ lymphocytes purified from thawed PBMC by sorting with anti-CD8 magnetic beads and an autoMACS separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were used to isolate anti-tumor CTL. Lymphocytes were seeded at 200–6,000 cells/well in 48 or 96 V-bottom microwells (Nunc, Roskilde, Denmark) and stimulated by the addition of irradiated (10,000 rads) LB2586-MEL.B cells (5,000/well) pretreated with 100 U/ml IFN-γ in a final volume of 200 µl IMDM supplemented with 10% HS, IDO inhibitor 1-methyl-L-tryptophan (200 µM), IL-2 (50 U/ml), IL-4 (3 ng/ml) and IL-7 (10 ng/ml). The microcultures were restimulated at days 7 and 14 by the addition of irradiated LB2586-MEL.B cells (3,000–5,000/well) and the same cytokine cocktail. Around day 21, aliquots collected from all microcultures were used as effector cells in a cytotoxicity assay, with ^{51}Cr -labeled targets including IFNγ treated LB2586-MEL.B cells, LB2586 EBV-transformed B cells and K562 (1,000 cells/well); a 50-fold excess of unlabeled K562 was added to quench the activity of NK-like effectors. Microcultures displaying a high level of tumor specific cytotoxic activity and prone to be clonal according to the Poisson distribution law were further restimulated in the same conditions and a second lytic assay was performed 2 weeks later in the absence of unlabeled K562 cells. To derive anti-tumor CTL clones from confirmed

lytic microcultures, CD8⁺ cells were sorted and cloned at 1 cell/microwell by use of a FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and restimulated with irradiated IFN- γ -treated LB2586-MEL.B cells (5×10^3 /well), irradiated allogenic LG2-EBV feeder cells (3×10^4 /well) in 200 μ l medium containing IL-2 (50 U/ml) and IL-7 (10 ng/ml). Cloned CTL were finally grown in 24-well plates (10^5 cells/well) with irradiated IFN- γ -treated LB2586-MEL.B cells (2×10^5 /well), irradiated allogenic LG2-EBV feeder cells (10^6 /well) in 2 ml medium containing IL-2 (50 U/ml) and IL-7 (10 ng/ml).

Cytotoxicity assay

Cytolytic activity was estimated in a chromium release assay as described previously [1]. Briefly, CTL were mixed with 1,000 ⁵¹Cr-labeled target cells; after 4 h, the radioactivity released in the supernatant was measured. For the peptide assay, ⁵¹Cr-labeled autologous EBV-transformed B cells (LB2586-EBV) were incubated with serially diluted peptides for 30 min before addition of the CTL. Peptides were synthesized on solid phase Fmoc for transient N-terminal protection and characterized by mass spectrometry. The 9-mer and 11-mer optimal peptides were further purified by rp-HPLC to give >99% purity. Lyophilized peptides were dissolved at 10 mg/ml in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored frozen.

TNF release assay

Target cells (2×10^4 /microwell) were incubated with CTL (2×10^3) in 100 μ l of culture medium supplemented with IL-2 (25 U/ml). After 24 h of coculture, the supernatant was collected and its TNF content was determined by testing its cytotoxic effect on WEHI 164 clone 13 cells as described [5, 20].

Transient transfection of COS-7 cells

Transfection was performed by the Lipofectamine method according to the manufacturer recommendations (Invitrogen). Briefly, COS-7 cells (1.5×10^4) distributed in flat bottom microwells the day before transfection were cotransfected in triplicate with 50 ng of pcDNA1/Amp or pcDNA3 plasmid containing the cDNA of one of the HLAs corresponding to the patient typing, together with 50 ng of a plasmid containing the cDNA of a gene encoding a tumor antigen, in the presence of 1 μ l of Lipofectamine in serum-free OPTIMEM medium (Invitrogen) in a final volume of 50 μ l. After a 5-h incubation at 37°C, 200 μ l

of DMEM medium supplemented with 10% FCS was added and incubation continued for 20 h. The transfection medium was discarded and the CTL to be tested for antigen recognition were added (2×10^3 /microwell) together with IL-2 (20 U/ml) in a final volume of 100 μ l. After 24 h, the supernatants were collected and their TNF content estimated as described above.

RT-PCR assay for expression of gene *MAGE-C2*

Expression of gene *MAGE-C2* in different cell lines was analyzed by reverse transcription-PCR as described, using primers SL102 and SL103 [14].

TCR analysis of CTL clones

TCR V α and V β chains were assessed by reverse transcription-PCR essentially as described [8], except that fluorescently labeled downstream primers (C α -HEX and C β -NED) (Eurogentec, Liège, Belgium) were used, allowing fast and accurate size determination simultaneously for the V α and V β PCR products that could be distinguished by their different fluorescence using the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer and the GeneScan software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products were purified and sequenced using the BigDye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) and the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer to obtain a complete identification of the CDR3 region.

Results

Isolation of anti-tumor CTL from a metastasis

Seven months after the onset of vaccinations with autologous dendritic cells pulsed with the MAGE-3.A1 peptide, a cutaneous metastasis was resected. Part of it was taken for establishment of a tumor cell culture, further referred to as LB2586-MEL.B. Another fragment was chopped into small pieces that were distributed into 20 wells in 1.5 ml culture medium containing autologous serum and IL-2. Two weeks later, lymphocytes which had exited from the tumor pieces and divided, were collected and restimulated in three pools of 4×10^5 cells with the LB2586-MEL.B tumor cells in a MLTC. After 14 days, a ⁵¹Cr release assay was performed on each MLTC; Fig. 1 is representative of one of them. It revealed that all three MLTCs contained cells that lysed the autologous tumor cells but did not lyse autologous EBV-transformed B cells and NK

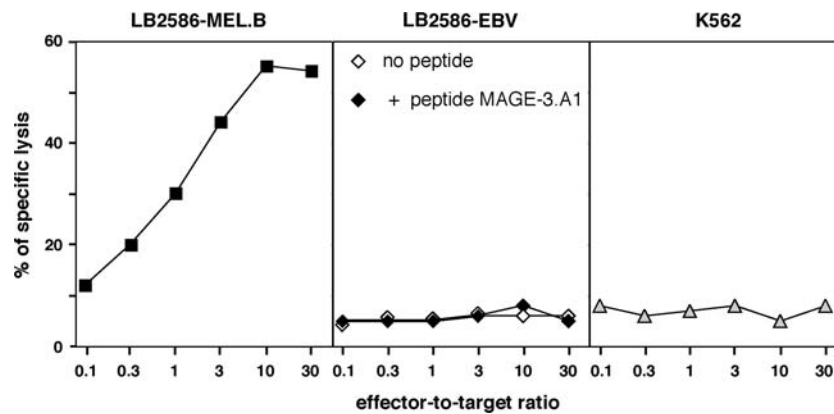


Fig. 1 Lysis of autologous melanoma cells LB2586-MEL.B by TILs maintained in MLTC for 14 days. LB2586-MEL.B melanoma cells were treated with 100 U/ml IFN- γ for 48 h before the test. Autologous EBV-transformed B cell line LB2586-EBV (either pulsed or not with 1 μ M MAGE-3.A1 peptide), and K562

cells were used as control targets. The lymphocytes were incubated at various effector-to-target ratios with 1,000 ^{51} Cr-labeled targets; unlabeled K562 were added in a 50-fold excess to avoid nonspecific lysis. ^{51} Cr release was measured after 4 h

target cells K562. Moreover, autologous EBV-B cells pulsed with the vaccine antigen MAGE-3.A1 were not lysed, suggesting that the TIL were not directed against the vaccine antigen. After cloning by limiting dilution, cytotoxic CD8 $^{+}$ clones were obtained. One T cell receptor was observed in several CTL clones derived from two of the three MLTCs, indicating the presence of at least two members of the same clonotype in the tumor. This clonotype is V β 19-J β 1.4, with CDR3 sequence tagtTTACGACAGGGCGGAgaaaaa... and V α 9.2-J α 37 with CDR3 sequence tctgGGAGGAtctg... and will be referred to as clonotype A. CTL 2.4 that belonged to this clonotype was able to lyse the autologous LB2586-MEL.B tumor cells but not the autologous EBV-B cells (Fig. 2a). It secreted TNF upon incubation with the autologous tumor cells (Fig. 2b). TNF secretion was inhibited by monoclonal antibody B1.23.2, indicating that the epitope is presented by HLA-B or -C molecules.

Identification of the antigen recognized by CTL 2.4

CTL 2.4 was incubated with COS-7 cells transiently cotransfected with plasmids containing cDNA of HLA-B or C corresponding to the patient alleles, together with the cDNA obtained from a set of genes known to encode tumor antigens. Secretion of TNF by the CTL was observed with COS cells cotransfected with cDNAs of HLA-B*4403 and MAGE-C2 (Fig. 3). To delimit the peptide-coding sequence, COS-7 cells were cotransfected with HLA-B*4403 cDNA and three different expression plasmids containing parts of the MAGE-C2 cDNA sequence [16]. The results indicated that the peptide recognized by CTL 2.4 was encoded within the last 211 nucleotides of the MAGE-C2 open reading frame (Fig. 3). Several peptides encoded within this region and bearing the HLA-B*4403 binding motif with E in position 2 and/or Y or F at the carboxyterminus, were synthesized. They were

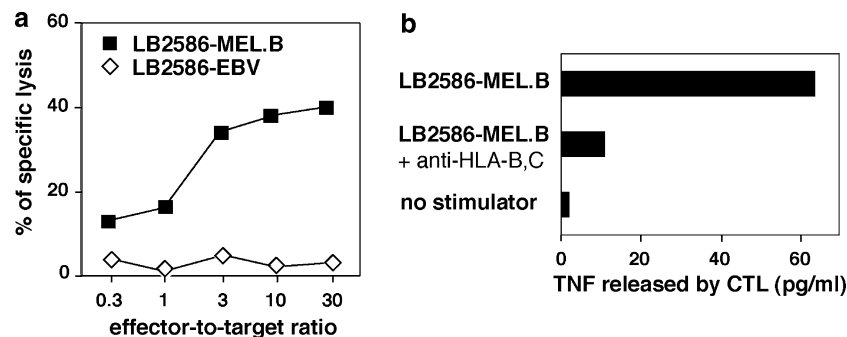


Fig. 2 a Specific lysis of autologous melanoma cells LB2586-MEL.B by CTL 2.4. Melanoma cells were treated with 100 U/ml IFN- γ for 48 h before the test. Autologous EBV-transformed B cell line LB2586-EBV was used as control target. ^{51} Cr release was measured after 4 h. **b** Recognition of autologous melanoma cells

LB2586-MEL.B by CTL 2.4 is inhibited by anti-HLA-B,C antibody. CTL 2.4 was cocultured with the IFN- γ -treated autologous melanoma cells in the absence or presence of anti-HLA-B,C antibody clone B1.23.2. After 24 h of coculture, the amount of TNF in the supernatant was measured by its toxicity on WEHI-13 cells

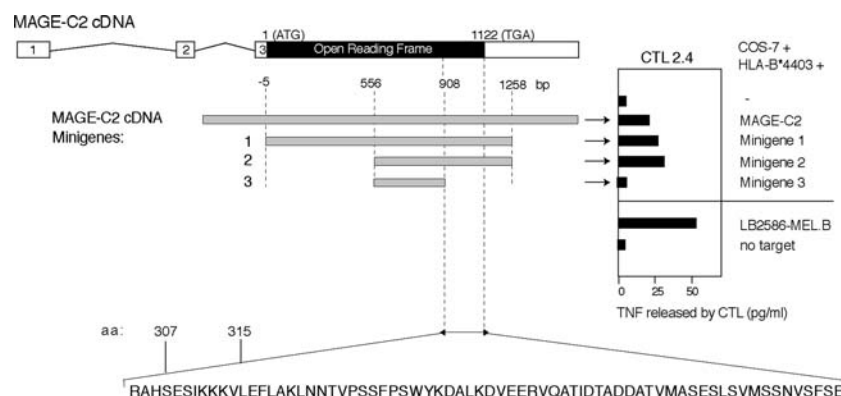


Fig. 3 Representation of the MAGE-C2 cDNA and minigenes used to identify the region coding for the antigenic peptide. Exons appear as *open boxes*, spliced introns as *kinky lines*, and the open reading frame as a *black box*. The minigene constructs corresponding to truncated fragments of the MAGE-C2 cDNA obtained by PCR are presented as *gray boxes*, with nucleotide

positions numbered starting from the first ATG of the ORF. These constructs were cotransfected into COS-7 cells with the HLA-B*4403 cDNA. Twenty-four hours later, recognition of the transfected cells by CTL 2.4 was tested in a TNF production assay. The antigenic peptide sequence (see Fig. 4) is underlined

tested for recognition by CTL 2.4 onto autologous EBV-B cells. Peptide_{307–317} and analogs elongated at the C-terminus were recognized, albeit at a relatively high concentration (Fig. 4). The undecapeptide contained two overlapping candidates, a nonapeptide starting at position 307 and a decapeptide starting at position 308. Only nonapeptide_{307–315} SESIKKKVL was recognized, with half-maximum lysis obtained at 40 nM (Fig. 4). This nonapeptide appeared to be the optimal peptide, as peptides truncated by one residue either at the C-terminus or the N-terminus were not efficiently recognized.

Many additional independent CTL clones recognizing peptide SESIKKKVL on autologous EBV-B cells and expressing the same TCR (clonotype A) were further isolated, either from other skin metastases resected at later time points, or from blood lymphocytes

collected in the course of vaccination. One of these clones is CTL 6.11.6 isolated from blood taken after one cycle of six vaccinations. This CTL recognized the antigen with affinity similar to CTL 2.4 (Fig. 4). It proliferated better in vitro and was used in further experiments.

Recognition of allogenic melanoma cell lines expressing MAGE-C2

CTL 6.11.6 was tested on the LB2586-MEL.G autologous melanoma cell line and on four allogenic melanoma lines expressing MAGE-C2 and HLA-B44. Two of them expressed B*4403 like the autologous line, one expressed B*4404 and one expressed B*4402. Recognition by CTL 6.11.6 was restricted to the cell lines expressing MAGE-C2 and HLA-B*4403 (Fig. 5). This

Fig. 4 Lysis by CTL 2.4 and CTL 6.11.6 of autologous EBV-transformed B cell line LB2586-EBV pulsed with the indicated peptides. The ⁵¹Cr-labeled LB2586-EBV B cells were pulsed for 30' with various concentrations of peptides. CTL 2.4 and CTL 6.11.6 were then added at an effector-to-target ratio of 10 and 3, respectively. ⁵¹Cr release was measured after 4 h

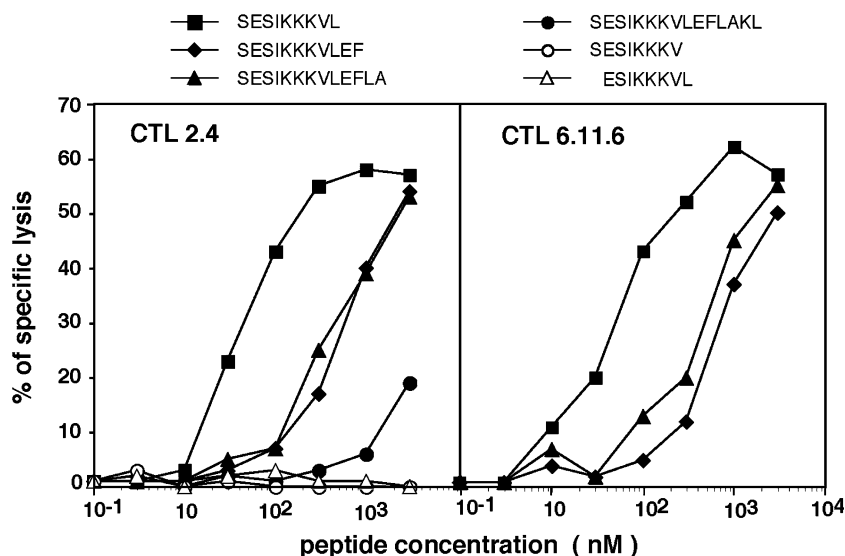
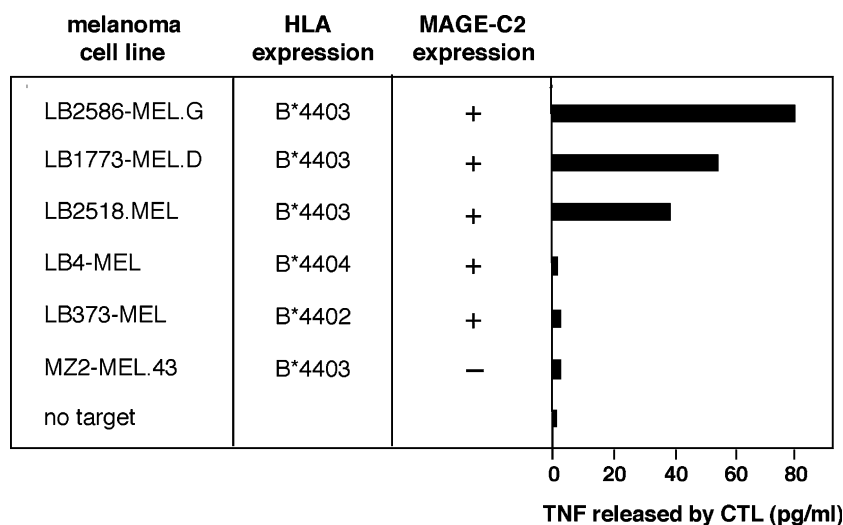


Fig. 5 Recognition of melanoma cell lines expressing MAGE-C2 by CTL 6.11.6 is restricted by HLA-B*4403. The melanoma cell lines, expressing various HLA-B44 molecules, were treated with IFN- γ and further incubated in the presence of CTL 6.11.6. After 24 h, the production of TNF was measured



restricted recognition was confirmed in lysis assay showing that CTL 6.11.6 was able to lyse MAGE-C2⁺ HLA-B*4403⁺ tumor cells exclusively, with 60% specific lysis at an effector-to-target ratio of 10 (data not shown).

Discussion

We report the molecular definition of a new antigen that is encoded by gene *MAGE-C2* and presented by HLA-B44. This identification relies on the recognition by CTL clones obtained either from metastases or from the blood of a melanoma patient enrolled in a vaccination protocol in which autologous mature dendritic cells pulsed with the MAGE-3.A1 peptide were injected. Their emergence in the course of patient LB2586 vaccination will be discussed elsewhere (J. Carrasco et al., manuscript in preparation). The clinical outcome of our patient who remains in complete remission more than 3 years after the initiation of therapeutic vaccination is encouraging and supports further investigation of the SESIKKKVL peptide for the therapeutic vaccination of HLA-B*4403 positive patients with MAGE-C2 expressing cancers.

Gene *MAGE-C2* is a member of the *MAGE* gene family, which comprises several genes located on chromosome X and which displays a cancer-germline expression pattern [4]. *MAGE-C2* is expressed in 40% of melanomas, 30% of bladder carcinomas, 20% of head and neck carcinomas and 10% of nonsmall cells lung carcinomas while silent in normal tissues, except in male germline cells, which are devoid of MHC class I molecules [14]. Genes of the *MAGE-A* cluster were found to encode a large number of tumor-specific antigens recognized by T lymphocytes [22]. Recently, three

antigenic peptides were found to be encoded by gene *MAGE-C2*, one of the four genes comprised in the *MAGE-C* cluster: two presented by HLA-A2 and one by HLA-B57 [7, 16].

HLA-B44 is expressed by 24% of Caucasians, thus being the most frequent HLA-B allele in this population [11, 13]. This allelic group comprises at least eight subtypes, among which predominate B*4402 (61%) and B*4403 (36%). The new MAGE-C2 antigenic peptide described here needs to be presented to clonotype A CTL in the context of HLA-B*4403. This may be due to the fact that the peptide binds specifically to HLA-B*4403 and not to the other B44 subtypes tested, as shown for other antigenic peptides [10]. Alternatively, assuming the peptide binds to various subtypes, the specificity of the CTL clone could be due to a particular conformation adopted by the peptide when bound to B*4403, for previous reports have shown that CTL are able to distinguish between various conformations adopted by the same peptide in two B44 or B35 subtypes [10, 21]. A third potential explanation is that clonotype A CTL, which is B*4403-restricted, shows strict specificity for this presenting HLA molecule although it differs from B*4402 or B*4404 only at residue 156 or residues 156 and 163, respectively; such strict specificity for one B44 allele has already been reported for an anti-MAGE-3 CTL derived from a B*4403 patient [10].

MAGE-C2 antigenic peptide SESIKKKVL presented by HLA-B*4403 is the fourth MAGE-C2 antigenic peptide which has been identified. The first three MAGE-C2 peptides have been identified in another melanoma patient who displayed impressive CTL responses against these antigens, reaching frequencies in the tumor of several percent of CD8 T cells. Some of these responses occurred spontaneously before

vaccination [7, 15]. High spontaneous responses have also been observed for antigens encoded by *LAGE-I* and *NY-ESO-1* [12, 17]. Whether this makes these antigens particularly useful for anti-tumoral vaccines will have to be determined by clinical experimentation.

Acknowledgments We thank V. Ha Thi, M. Panagiotakopoulos and M. Swinarska for technical assistance, W. Ma for providing the MAGE-C2 minigenes, and V. Stroobant for peptide synthesis. We thank P. van der Bruggen for critical reading, and N. Krack for editorial assistance. This work was supported by the Belgian Programme on Interuniversity Poles of Attraction initiated by the Belgian State, Prime Minister's Office, Science Policy Programming, and by a grant of the Fédération Belge contre le Cancer. Javier Carrasco was supported by a grant FNRS-TELEVIE.

References

- Boon T, Van Snick J, Van Pel A, Uyttenhove C, Marchand M (1980) Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815 II T lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 152:1184–1193
- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B, van der Bruggen P (2006) Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:6.1–6.34
- Brasseur F (1999) Melanoma: Brussels Melanoma cell lines. In: Masters JRW, Palsson B (eds) *Human cell culture*, vol 1. Kluwer, Dordrecht, pp 275–282
- Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S (2001) An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 61:5544–5551
- Espevik T, Nissen-Meyer J (1986) A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95:99–105
- Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethé B, Brasseur F, Boon T (1994) Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 179:921–930
- Germeau C, Ma W, Schiavetti F, Lurquin C, Henry E, Vigneron N, Brasseur F, Lethé B, De Plaen E, Velu T, Coulie PG (2005) High frequency of anti-tumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J Exp Med* 201:241–248
- Godelaine D, Carrasco J, Lucas S, Karanikas V, Schuler-Thurner B, Coulie PG, Schuler G, Boon T, Van Pel A (2003) Polyclonal CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a MAGE-3.A1 peptide. *J Immunol* 171:4893–4897
- Haas GG Jr, D'Cruz OJ, De Bault LE (1988) Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18:47–51
- Herman J, Jongeneel V, Kuznetsov D, Coulie PG (1999) Differences in the recognition by CTL of peptides presented by the HLA-B*4402 and the HLA-B*4403 molecules which differ by a single amino acid. *Tissue Antigens* 53:111–121
- Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T (1991) Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds) *XIth international histocompatibility workshop and conference*, vol 1. Oxford University Press, New York, p 1065
- Jäger E, Chen Y-T, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A (1998) Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 187:265–270
- Lee TD (1990) Distributions of HLA antigens. In: Lee J (ed) *The HLA system A new approach*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 141–178
- Lucas S, De Plaen E, Boon T (2000) *MAGE-B5*, *MAGE-B6*, *MAGE-C2* and *MAGE-C3*: four new members of the *MAGE* family with tumor-specific expression. *Int J Cancer* 87:55–60
- Lurquin C, Lethé B, Corbière V, Théate I, van Baren N, Coulie PG, Boon T (2005) Contrasting frequencies of anti-tumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J Exp Med* 201:249–257
- Ma W, Germeau C, Vigneron N, Maernoudt A-S, Morel S, Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B (2004) Two new tumor-specific antigenic peptides encoded by gene *MAGE-C2* and presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-A2. *Int J Cancer* 109:698–702
- Rimoldi D, Rubio-Godoy V, Dutoit V, Liénard D, Salvi S, Guillaume P, Speiser D, Stockert E, Spagnoli G, Servis C, Cerritini J-C, Lejeune F, Romero P, Valmori D (2000) Efficient simultaneous presentation of NY-ESO-1/LAGE-1 primary and nonprimary open reading frame-derived CTL epitopes in melanoma. *J Immunol* 165:7253–7261
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10:909–915
- Schultz ES, Lethé B, Cambiaso CL, Van Snick J, Chaux P, Corthals J, Heirman C, Thielemans K, Boon T, van der Bruggen P (2000) A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4⁺ cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* 60:6272–6275
- Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ohta N, Old L, Boon T (1992) Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 35:145–152
- Tynan FE, Elhassen D, Purcell AW, Burrows JM, Borg NA, Miles JJ, Williamson NA, Green KJ, Tellam J, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J, Burrows SR (2005) The immunogenicity of a viral cytotoxic T cell epitope is controlled by its MHC-bound conformation. *J Exp Med* 202:1249–1260
- Van den Eynde B, van der Bruggen P. Peptide database of T-cell defined tumor antigens. URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>
- van der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T (2002) Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 188:51–64