



Développement de stratégies d'immunothérapies cellulaires basées sur l'activation de lymphocytes T CD4+ humains à l'aide de cellules présentatrices d'antigène artificielles.

Alexandre Couture

► To cite this version:

Alexandre Couture. Développement de stratégies d'immunothérapies cellulaires basées sur l'activation de lymphocytes T CD4+ humains à l'aide de cellules présentatrices d'antigène artificielles.. Immunothérapie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR066 . tel-03085781

HAL Id: tel-03085781

<https://theses.hal.science/tel-03085781>

Submitted on 22 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

**Spécialité Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
– Immunologie –**

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

**Développement de stratégies d'immunothérapie cellulaire basées sur
l'activation de LT CD4⁺ humains à l'aide de cellules présentatrices
d'antigène artificielles**

**Présentée et soutenue par
Alexandre COUTURE**

Thèse soutenue publiquement le 14 Décembre 2018
devant le jury composé de :

Pr Pierre TIBERGHEN	PU-PH, Etablissement Français du Sang de Bourgogne Franche-Comté, Inserm UMR1098, Université de Franche-Comté	Rapporteur
Pr Christian BOITARD	PU-PH, Institut Cochin, Inserm UMR1016, Université Paris Descartes	Rapporteur
Pr Sophie CANDON	PU-PH, Inserm UMR1234, Université de Rouen Normandie	Examineur
Pr Brigitte LE-MAUFF	PU-PH, Inserm UMRS1237, Université de Caen Normandie	Examineur
Dr Catherine RABU	MCU, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers, Inserm UMR1232, Université de Nantes	Examineur
Dr Sophie SIBERIL	MCU, Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm UMRS1138, Université Paris Descartes et Sorbonne Université	Examineur
Dr Jean-Baptiste LATOUCHE	MCU-PH, Inserm UMR1245, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Dr Olivier TOUTIRAIS	MCU-PH, Etablissement Français du Sang de Caen, Inserm UMRS1237, Université de Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse co-dirigée par le Dr Jean-Baptiste LATOUCHE et le Dr Olivier TOUTIRAIS

**Unité Inserm UMR1245 - Génomique et médecine personnalisée
du cancer et des maladies neuropsychiatriques**



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Christian Boitard et le Professeur Pierre Tiberghien de me faire l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Merci également au Professeur Sophie Candon, au Professeur Brigitte Le-Mauff, au Docteur Sophie Sibéril et au Docteur Catherine Rabu d'avoir accepté d'examiner ces travaux.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Christophe Ferrand, le Docteur Myriam Bernaudin et le Docteur Cécile Bergua pour avoir fait partie de mon comité de suivi individuel de thèse, dont faisait également partie le Docteur Catherine Rabu. Un grand merci pour votre accompagnement au cours de ce projet.

Ici, je souhaite également remercier le Professeur Thierry Frebourg, directeur de l'unité Inserm dans laquelle j'ai réalisé ma thèse. Je vous remercie sincèrement pour votre soutien, pour vos précieux conseils et pour l'aide que vous m'avez apporté.

Cher Jean-Baptiste, je tiens premièrement à te remercier pour m'avoir donné ma chance au cours de ces cinq dernières années. Merci beaucoup d'avoir cru en moi et de m'avoir fait partager tes nombreuses connaissances scientifiques de grandes qualités. Merci de m'avoir emmené dans de prestigieux congrès et de m'avoir fait rencontrer de nombreux chercheurs, experts en immunothérapie des cancers. Merci beaucoup pour nos nombreuses réflexions scientifiques et pour m'avoir guidé durant ce projet. Ces cinq années passées à tes côtés furent extrêmement enrichissantes, tant sur le plan professionnel que personnel. Enfin, un très grand merci pour tes qualités humaines que je n'oublierai jamais.

Cher Olivier, je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour la précieuse aide et les nombreux conseils que tu m'as apportés au cours de cette thèse. Un grand merci pour m'avoir hébergé sur Caen, pour m'avoir accueilli, Brigitte et toi, dans votre laboratoire et pour m'avoir initié à certaines manips. Ce fut un réel plaisir d'écrire une revue avec toi. Tes qualités scientifiques et humaines m'ont beaucoup apporté tout au long de ce projet. Je n'oublierai pas les longues discussions scientifiques très enrichissantes que nous avons eues avec Brigitte et Jean-Baptiste. Je tiens sincèrement à t'exprimer toute ma reconnaissance pour ton soutien qui me fut très précieux pour mener à bien ce travail. Merci également pour tes conseils et pour ton aide dans la réalisation de ce manuscrit. Mille mercis !

Je tiens également à remercier l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement ainsi que l'Université de Rouen pour le suivi, l'aide et le soutien qu'ils apportent à leurs étudiants. Un grand merci également pour les formations de grandes qualités que vous dispensez.

Nathalie, comment te remercier ? Combien de fois m'as-tu sauvé depuis que je suis au labo ? Je ne le compte même plus[^] Je tiens sincèrement à te remercier pour ton aide, ton efficacité, ton soutien, ta bonne humeur et pour toutes tes merveilleuses qualités ! Un très grand merci !

Dr Marinette Curie ! Ce fut un vrai plaisir et un immense honneur de réaliser cette thèse en même temps que toi. Que d'énergie réunie en une seule et même personne ! Je n'aurai jamais pensé que cela puisse être possible[^] Piloter des avions, monter à cheval, escalader des bâtiments,

connaître tout le répertoire de la grande variété Française, réciter de multiples poèmes, des citations de films et même certains passages des textes saints. Et au passage... faire une brillante thèse. Merci beaucoup pour cette énergie positive que tu m'as apportée, pour ta bonne humeur, tes précieux conseils et ton soutien ! Ne change rien Marinette, hormis ton niveau au bilboquet peut-être...

Sabine, je te remercie d'avoir été présente tout au long de notre Master et de cette thèse. Ce fut un réel plaisir de partager cette expérience avec toi et j'en suis vraiment très heureux. Tu es une personne formidable avec qui j'ai partagé de très bons moments et pour cela, un grand merci. J'espère qu'il y en aura encore beaucoup d'autres. Merci beaucoup pour m'avoir encouragé dans les moments compliqués. Ton aide m'a beaucoup apporté. Je te souhaite le meilleur pour la suite petite Sissi^^

Camille, je tiens sincèrement à te remercier pour ta précieuse aide tout au long de ce projet. Merci pour ton aide dans les manips et dans la relecture de ce manuscrit. Un grand merci également d'avoir supporté ma musique en pièce de culture cellulaire^^ Ce fut un grand plaisir de travailler avec toi Fanfouette^^ Plein de bonnes choses à toi pour la suite !

Estelle et Hafidou, mes aînés^^ Je tiens premièrement à vous remercier de m'avoir enseigné les bases de la biologie moléculaire et cellulaire. Bien au-delà de ça, je tiens à vous remercier pour votre précieuse aide et vos conseils, qui m'ont tant apporté. Un grand merci pour tous les super moments que j'ai passés avec vous les amis ! Vous m'avez énormément apporté.

Edwige, un très grand merci pour tous les conseils que tu m'as apportés et pour ton soutien à toute épreuve. Tu as été un véritable modèle, tant pour tes qualités humaines que scientifiques. Kilan, je tiens également à te remercier pour l'aide et le soutien que tu m'as apportés durant cette thèse. Je vous souhaite le meilleur les amis, tant sur le plan personnel que professionnel.

Omar, mon Dr, je te suis sincèrement reconnaissant pour ton soutien, et pour l'aide que tu m'as fournie, et cela depuis mon arrivée au laboratoire. Ta gentillesse et ta bienveillance m'ont beaucoup apporté. Un grand merci mon ami !

Pierre Boc, un grand merci pour tes nombreuses qualités humaines. De même que les « anciens thésards » du labo, tu m'as beaucoup appris tout au long de ta présence au labo. Mille mercis également pour tes super tours de magie et pour tes séances d'hypnoses^^ avant les manips de culture cellulaire, c'est super efficace ! xD

Hélène, je te remercie sincèrement pour ton aide lors de la rédaction de ce manuscrit et pour tes précieux conseils lors des manips de clonage. Ta capacité de travail et ta rigueur scientifique m'ont toujours impressionné^^ Un grand merci pour cette dynamique positive que tu m'as apportée. Un grand merci pour ton soutien !

Anthony, je tiens sincèrement à te remercier pour m'avoir enseigné les manips de fonctionnel et pour t'être rendu disponible à de nombreuses fois pour que je puisse te joindre car j'avais besoin de conseils^^ merci beaucoup pour ton aide.

Gaëtan, comment aurai-je pu avancer sur ce projet sans ton aide ? Merci beaucoup de m'avoir enseigné les principes de la cytométrie en flux et d'avoir été présent pour m'aider dans ce projet. Un grand merci également à Léa, Baptiste, Laurent, Maud, Sahil et aux membres du laboratoire d'Immunologie pour leurs précieux conseils.

Ludivine, nous sommes également arrivés au labo en même temps et je tiens à te remercier pour ta sympathie et pour le soutien que tu m'as apporté au cours de ces 5 années.

Laëtitia, un grand merci pour les bons moments passés ensemble au labo. Merci pour ton soutien à la « team Immuno », pour ta bonne humeur et ta « rebelle attitude » sur laquelle on te taquine tant^^ Comme pour CLF, je vous souhaite le meilleur pour votre fin de thèse. Force & honneur. Et n'oublie pas de bien prendre soin du Pilote^^

Stéphane, un grand merci pour ton précieux soutien et pour ton aide depuis que je suis arrivé dans l'unité. Nos longues discussions footballistiques vont me manquer. Je compte sur toi pour encourager le Paris-Saint-Germain dans la quête de la Ligue des Champions^^

Raphaël, je te remercie sincèrement pour ton soutien depuis mes premiers pas dans l'unité. Nos longues discussions vont également beaucoup me manquer. Je dois t'avouer que ta réussite de 100% au bilboquet m'impressionne toujours^^ Fais attention car ton padawan commence à avoir un petit niveau à ce jeu^^ D'ailleurs, un grand merci également à M. Steeve pour les bons moments que nous avons passés ensemble. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite les amis.

Merci à tous les membres de l'unité Inserm U1245 pour votre disponibilité et pour votre précieuse aide ! Un grand merci à Anne, Sophie, Olivier, Magalie, Gaël, Anne-Claire, Camille, Shirin, Françoise, Aurélie, Myriam, Sébastien, Laëtitia, François, Thomas, Maud, Pauline, Morgane, Kévin, Isa, Gaëlle, Pascaline et Xana.

Romain, Max et Pierre, mes vieux amis ! Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse. Nos fameuses sorties du samedi soir furent une grande bouffée d'oxygène pour moi, malgré ces défaites catastrophiques sur FIFA^^ Un immense merci !

Je tiens à remercier très chaleureusement ma famille et ma belle-famille pour votre précieux soutien. Un merci particulier à mes parents, sans qui ce travail n'aurait pu se faire. Je vous serai toujours reconnaissant de m'avoir donné la possibilité de prendre mes propres décisions, de me conseiller et de me soutenir dans mes différents projets. Un grand merci pour avoir toujours cru en moi. A mon frère et à sa famille, un immense merci pour les bons moments passés ensemble. C'est un grand honneur et un grand bonheur d'être le parrain du petit Raphaël, merci beaucoup !

Anaïs, je crois tout simplement qu'il n'existe pas de mots adéquats pour te remercier à la hauteur de tout ce que tu m'as apporté au cours de ces 8 dernières années. D'une certaine façon, ce travail t'appartient également...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	4
LISTE DES ABBREVIATIONS	5
RESUME	11
SUMMARY	13
INTRODUCTION	15
Chapitre I – Ontogénie, différenciation et fonctions des LT CD4 ⁺	15
A- Ontogénie des LT CD4 ⁺ : sélection thymique et génération des LT naïfs	17
B- Les LT CD4 ⁺	19
1) Les LT CD4 ⁺ effecteurs.....	19
a) Cas particulier des LT double positifs et les LT double négatifs	19
b) Les lymphocytes Th1.....	20
c) Les lymphocytes Th2.....	21
d) Les lymphocytes Th9.....	21
e) Les lymphocytes Th17.....	22
f) Les lymphocytes Tfh	23
g) Les lymphocytes Th22.....	24
h) Les lymphocytes T CD4 ⁺ cytotoxiques.....	25
2) Les lymphocytes T CD4 ⁺ régulateurs	25
C- Les LT mémoires.....	30
1) Les sous-populations de LT mémoires.....	30
a) Les LT mémoires souches (T _{SCM})	30
b) Les LT mémoires centraux (T _{CM})	31
c) Les LT mémoires transitionnels (T _{TM}).....	32
d) Les LT mémoires effecteurs (T _{EM})	32
e) Les LT mémoires résidents (T _{RM})	32
2) Différenciation des LT mémoires	35
Chapitre II- Activation des LT CD4 ⁺	38
A- Signal 1 : présentation de l'antigène par les molécules HLA-II	40
1) Les molécules HLA-II.....	40
2) Voie exogène de présentation de l'antigène	42
3) Voie endogène de présentation de l'antigène	45
a) Les voies autophagiques.....	47
b) Les voies non-autophagiques.....	49
c) Exemple de l'antigène NY-ESO-1.....	50
d) Conclusion	51
4) Le transfert de membrane (<i>cross-dressing</i>)	52

a)	<i>Cross-dressing direct</i>	52
b)	<i>Cross-dressing indirect</i>	53
c)	<i>Conclusion</i>	54
5)	<i>Epissage des peptides</i>	55
a)	<i>Epissage des peptides T CD8⁺</i>	55
b)	<i>Epissage des peptides T CD4⁺</i>	56
B-	Signal 2 : molécules de costimulation	58
1)	La superfamille des immunoglobulines (SF-Ig)	58
a)	CD28/B7.1 et B7.2	58
b)	CTLA-4/B7.1 et B7.2	59
c)	PD-1/PD-L1 et PD-L2	60
d)	ICOS/ICOSL	60
2)	La superfamille des récepteurs au TNF (TNFRSF)	61
a)	CD27/CD70	61
b)	HVEM/LIGHT	62
c)	OX40/OX40L	62
d)	4-1BB/41BBL	63
3)	La famille des molécules TIM	64
a)	Voie TIM-1	64
b)	Voie TIM-2	65
c)	Voie TIM-3	65
d)	Voie TIM-4	66
C-	Signal 3 : les cytokines	67
1)	L'IL-2	67
2)	L'IL-7	69
3)	L'IL-15	70
	Chapitre III – Nature des antigènes tumoraux	71
A-	Les antigènes partagés	71
1)	Les antigènes de différenciation	71
2)	Les antigènes CT (<i>Cancer Testis</i>) ou antigènes germinaux	72
3)	Les antigènes surexprimés	72
B-	Les antigènes viraux et les néoantigènes	73
1)	Les antigènes viraux	73
2)	Les néoantigènes	73
	Chapitre IV- Stratégies d'immunothérapie cellulaire dans les cancers : rôle majeur des LT CD4⁺	75
A-	Systèmes artificiels de présentation de l'antigène pour activer des LT CD4⁺ humains ...	77
1)	Systèmes acellulaires de présentation de l'antigène	77
a)	Les billes magnétiques	77
b)	Les liposomes et les exosomes	78

2)	Systèmes cellulaires de présentation de l'antigène	78
a)	Les cellules présentatrices d'antigène artificielles allogéniques.....	78
b)	Les cellules présentatrices d'antigène artificielles xénogéniques.....	79
	B- Immunothérapie cellulaire adoptive dans les cancers	82
1)	Les LT non modifiés.....	82
2)	Les LT modifiés génétiquement	85
a)	Les CAR-T cells.....	85
b)	Les LT à TCR transgéniques	88
	OBJECTIFS	89
	A- Optimisation de la présentation des antigènes par des CPAA-II.....	89
	B- Evaluation des capacités des nouvelles CPAA-II à générer des effecteurs T CD4 ⁺	91
	RESULTATS	92
	Article : ciblage de la voie de présentation des antigènes par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II dans des cellules présentatrices d'antigène artificielles pour activer efficacement des lymphocytes T CD4 ⁺ humains spécifiques.....	92
	DISCUSSION	128
	A- Capacité des CPAA-II chargées de manière exogène avec un antigène d'intérêt à stimuler des LT CD4 ⁺ spécifiques	128
	B- Capacité d'apprêtement antigénique des nouvelles lignées de CPAA-II codant l'antigène d'intérêt.....	130
	C- Capacité des CPAA-II codant l'antigène d'intérêt à stimuler des LT CD4 ⁺ spécifiques ...	132
	D- Capacité des CPAA-II codant l'antigène d'intérêt à restimuler des LT CD4 ⁺ mémoires..	134
	E- Optimisation du protocole <i>in vitro</i> d'activation et d'amplification de LT CD4 ⁺ spécifiques	136
	F- Autres intérêts des CPAA-II.....	137
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	139
	REFERENCES.....	141
	ANNEXES	176
	Annexe I : Article : stimulation <i>in vitro</i> « personnalisée » de lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux basée sur l'utilisation de cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) codant des peptides dérivés de néoantigènes spécifiques de la tumeur, chez des patients atteints de cancers colorectaux a instabilité microsatellitaire	176
	Annexe II : Revue : Cellules présentatrices d'antigène artificielles exprimant une molécule HLA-II dans les stratégies d'immunothérapie cellulaire basées sur l'activation <i>in vitro</i> de LT CD4 ⁺	205

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Voies de différenciation des sous-populations de LT CD4 ⁺	18
Figure 2 : Mécanismes de suppression médiés par les Treg	27
Figure 3 : Phénotype des principales sous-populations de LT mémoires.....	29
Figure 4 : Modèles de différenciation des cellules T mémoires	34
Figure 5 : Activation des LT CD4 ⁺	37
Figure 6 : Structure des molécules HLA-II	39
Figure 7 : Présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH-II.....	41
Figure 8 : Mécanismes impliqués dans le transport des antigènes exogènes dans le compartiment MIIC.....	44
Figure 9 : Mécanismes d'autophagie impliqués dans le transport des antigènes endogènes dans le compartiment MIIC	46
Figure 10 : Présentation de l'antigène et mécanisme d'épissage peptidique.....	48
Figure 11 : Systèmes artificiels d'activation lymphocytaire.....	76
Figure 12 : Immunothérapie cellulaire adoptive anti-tumorale.....	81
Figure 13 : Les différentes générations de CAR	84
Figure 14 : Ciblage de la voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH-II dans notre modèle de CPAA.....	90
 Tableau 1 : Rôles des molécules de costimulation dans la différenciation des LT CD4 ⁺	 57

LISTE DES ABBREVIATIONS

4-1BBL: *4-1BB Ligand*

7-AAD: *7-AminoActinomycine D*

ACE : *Antigène Carcino-Embryonnaire*

ADAMTS13: *A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats-13*

ADP : *Adénosine DiPhosphate*

AHR: *Aryl Hydrocarbon Receptor*

AICD: *Activation Induced Cell Death*

AMP : *Adénosine MonoPhosphate*

AP: *Adaptator Protein*

Atg8/LC3: *Autophagy-related protein 8/microtubule-associated protein Light Chain 3*

ATP : *Adénosine TriPhosphate*

Bad: *Bcl-2-associated death promoter*

Bax: *Bcl-2-associated x protein*

Bcl-2: *B cell lymphoma-2*

Bcl-6: *B cell lymphoma-6*

Bcl-xL: *B cell lymphoma-extra Large*

Bid: *Bh3-interacting domain death agonist*

Bim: *Bcl-2-interacting mediator of cell death*

BTLA: *B and T Lymphocyte Attenuator*

CCR7: *C-C chemokine Receptor type 7*

CD40L: *CD40 Ligand*

CDR: *Complementarity-Determining Region*

CIITA: *Class II major histocompatibility complex TransActivator*

CLIP: *CLass II-associated Invariant chain Peptide*

CMH : *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*

CMV : *CytoMégaloVirus*

CPA : *Cellule Présentatrice d'Antigène*

CPAA : *Cellule Présentatrice d'Antigène Artificielle*

CRISPR/Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr associated protein 9*

CRS: *Cytokine Release Syndrome*

CRTAM: *Class I-Restricted T cell Associated Molecule*

CT: *Cancer Testis*

CTLA-4: *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*

DC: *Dendritic cell*

EBNA1: *Epstein-Barr Nuclear Antigen 1*

EBV: *Epstein-Barr Virus*

EEA1: *Early Endosome Antigen 1*

Eomes: *Eomesodermin*

ERAP: *Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase*

ERBB2IP: *ERBB2 Interacting Protein*

ESCRT: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

FasL: *Fas Ligand*

Fc : *Fragment cristallisable*

FDA: *Food and Drug Administration*

FLIP: *Flice-Like Inhibitory Protein*

FoxO1: *Forkhead box O1*

FoxO3: *Forkhead box O3*

FoxP3: *Forkhead box P3*

FRESH: *Function, Remanence, Expansion, Survival, Homing*

GATA-3: *GATA binding protein-3*

GILT: *Gamma-Interferon-inducible Lysosomal Thiol reductase*

GITR: *Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

gp100: *glycoprotein 100*

gp75: *glycoprotein 75*

GVHD: *Graft Versus Host Disease*

HA : *HémAgglutinine*

HLA: *Human Leukocyte Antigen*

HPV: *Human Papilloma Virus*

HSP: *Heat Shock Protein*

hTERT: *human TElomerase Reverse Transcriptase*

HVEM: *Herpes Virus Entry Mediator*

ICA : *Immunothérapie Cellulaire Adoptive*

ICAM-1: *InterCellular Adhesion Molecule-1*

ICOS: *Inducible COStimulatory molecule*

ICOSL: *Inducible COStimulatory molecule Ligand*

IDO: *InDeOlamine 2,3 dioxygenase*

IFN- γ : *InterFéroN- γ*

Ig : *Immunoglobuline*

Ii : *chaîne Invariante*

IL : *InterLeukine*

ILC: *Innate Lymphoid Cell*

IPEX: *Immunodysregulation, Polyendocrinopathy and Enteropathy, X-linked*

ITAM: *Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif*

iTreg: *induced Treg cell*

JAK: *JAnus Kinase*

LAG-3: *Lymphocyte Activation Gene-3*

LAMP-2a: *Lysosome Associated Membrane Protein-2a*

LB : *Lymphocyte B*

LFA-3: *Lymphocyte Function-associated Antigen-3*

LIGHT: *Lymphotoxin-like, exhibits Inducible expression, and competes with herpes simplex virus Glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed on T lymphocytes*

LNGFR: *Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor*

LNSC: *Lymph Node Stromal Cell*

LT : *Lymphocyte T*

LTC : *Lymphocyte T Cytotoxique*

MAGE: *Melanoma-associated AntiGEn*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MARCH1: *Membrane-Associated Ring-CH1*

Mcl-1: *induced Myeloid cell leukemia differentiation protein-1*

MDSC: *Myeloid-Derived Suppressor Cell*

Melan-A/MART-1: *Melanoma Antigen Recognized by T cells-1*

MELOE-1: *MELanoma-OverExpressed antigen-1*

MIIC: *Major histocompatibility complex class-II Compartment*

MMR: *DNA MisMatch Repair system*

NFAT: *Nuclear Factor of Activated T-cells*

NF- κ B: *Nuclear Factor- κ B*

NGS: *Next Generation Sequencing*

NK: *Natural Killer*

NKG2A: *Natural Killer Group 2 A*

NOD: *Non-Obese Diabetic*

NSG: *Nod Scid Gamma*

nTreg: *natural Treg cell*

NY-ESO-1: *New York-ESOphageous-1*

OVA : *OVALbumine*

OX40L: *OX40 Ligand*

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PBTL: *Peripheral Blood T Lymphocyte*

PD-1: *Programmed Death-1*

PD-L1: *Programmed Death-Ligand 1*

PD-L2: *Programmed Death-Ligand 2*

PI3K: *PhosphoInositide-3 Kinase*

PKB: *Protein Kinase B*

PSMA: *Prostate-Specific Membrane Antigen*

pTreg: *peripheral Treg cell*

RAG: *Recombination Activating Gene*

RE : *Réticulum Endoplasmique*

ROR γ t: *Retinoic acid receptor-related ORphan receptor γ restricted to the thymus*

scFv: *single chain Fragment variable*

SEMA4A: *SEMAphorin 4A*

SF-Ig : *SuperFamille des Immunoglobulines*

SI : *Système Immunitaire*

STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*

T1D: *Type 1 Diabetes*

TAP: *Transporter associated with Antigen Processing*

T-bet: *T-box expressed in T cells*

T_{CM}: *Central Memory T cell*

TCR: *T-Cell Receptor*

T_{EM}: *Effector Memory T cell*

Tfh: *follicular helper T cell*

Tfr: *follicular regulatory T cell*

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*

Th: *helper T cell*

TIGIT: *T cell immunoreceptor with ImmunoGlobulin and ITim domains*

TIL: *Tumor Infiltrating Lymphocyte*

TIM: *T-cell Immunoglobulin domain and Mucin domain*

T_N: *Naïve T cell*

TNFRSF: *Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*

TNM: *Tumor, Node, Metastase*

Tr1: *type 1 regulatory T cells*

TRAIL: *Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

Treg : *Lymphocyte T régulateur*

T_{RM}: *Resident Memory T cell*

TRP-1: *Tyrosinase Related Protein-1*

T_{SCM}: *Stem Cell-like Memory T cell*

T_{TE}: *Terminal Effector T cell*

T_{TM}: *Transitional Memory T cell*

tTreg: *thymus-derived Treg cell*

V(D)J: *Variable, (D)iversity, Joining*

VH: *Variable Heavy*

VIH : *Virus de l'Immunodéficience Humaine*

VL: *Variable Light*

ZAP-70: *Zeta-chain-Associated Protein kinase 70*

γ c: *gamma chain*

RESUME

Les lymphocytes T (LT) CD4⁺ auxiliaires soutiennent l'action des LT CD8⁺ cytotoxiques (LTC) au cours des réponses immunitaires anti-tumorales. Des protocoles d'immunothérapie cellulaire adoptive (ICA) basés sur l'injection d'effecteurs T CD4⁺ ont donc été développés pour traiter les cancers, et ils ont montré une efficacité thérapeutique. Cependant, la difficulté de disposer de cellules présentatrices d'antigène (CPA) autologues permettant de générer un nombre suffisant de LT CD4⁺ spécifiques fonctionnels *in vitro* dans un court délai représente un obstacle majeur au développement de telles approches.

Pour contourner cette difficulté, notre groupe a précédemment développé des cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) dérivant de fibroblastes murins NIH/3T3 et exprimant les molécules nécessaires pour activer des LT CD4⁺ humains : une molécule HLA (*Human Leucocyte Antigen*) de classe II (ici HLA-DR1), la molécule de costimulation CD80 et les molécules d'adhérence CD54 et CD58.

Dans ce travail, nous avons cherché à optimiser nos CPAA DR1⁺ (CPAA^{DR1}) en permettant une expression endogène et constitutive de l'antigène d'intérêt (ici l'hémagglutinine, HA), sous forme de peptide ou de protéine, au niveau des compartiments cellulaires impliqués dans la présentation des antigènes par les molécules HLA-II. Nous avons montré que les CPAA^{DR1} « endogènes » exprimant le peptide HA au niveau du réticulum endoplasmique (RE) ou la protéine HA à la membrane plasmique, possédaient les meilleures capacités de présentation de l'antigène. En stimulation primaire, ces deux lignées de CPAA^{DR1} activaient des LT CD4⁺ spécifiques de HA, mais avec une capacité moindre que des CPA autologues. En revanche, en restimulation, les CPAA^{DR1} exprimant le peptide HA dans le RE étaient même plus efficaces pour amplifier des LT CD4⁺ spécifiques fonctionnels que des CPAA^{DR1} ou des CPA autologues chargées avec le peptide d'intérêt. Les LT obtenus étaient des cellules Th1 mémoires exprimant du granzyme B et produisant de l'IFN- γ et du TNF- α .

C'est la première fois à notre connaissance qu'un antigène exprimé de façon endogène dans une lignée cellulaire peut-être présenté de façon efficace sur une molécule HLA de classe II. Nos CPAA « endogènes » constituent donc un nouvel outil unique pour générer de façon reproductible et standardisable des réponses T CD4⁺ spécifiques, et pourraient déboucher sur le développement de nouvelles approches d'ICA.

Mots clefs : lymphocytes T CD4⁺, présentation de l'antigène, cellules présentatrices d'antigène artificielles, immunothérapie

SUMMARY

CD4⁺ helper T lymphocytes (TLs) sustain CD8⁺ cytotoxic TL (CTL) activity during anti-tumor immune responses. Adoptive cell immunotherapy (ACI) protocols based on the injection of CD4⁺ T-effectors have therefore been developed to treat cancers, and they have proven therapeutic efficacy. However, the difficulty of obtaining autologous antigen presenting cells (APCs) for generating a sufficient number of functional specific CD4⁺ TLs in a short time *in vitro* is a major obstacle to the development of such approaches.

To bypass this difficulty, our group has previously developed artificial antigen presenting cells (AAPCs) derived from NIH/3T3 murine fibroblasts expressing molecules necessary to activate human CD4⁺ TLs: an HLA (Human Leucocyte Antigen) class II molecule (in this study HLA-DR1), CD80 costimulatory molecule, and CD54 and CD58 adhesion molecules.

In this work, we sought to optimize our DR1⁺ AAPCs (AAPC^{DR1}) by allowing an endogenous and constitutive expression of the antigen of interest (in this study hemagglutinin, HA), as a peptide or a whole protein, in different cell compartments involved in antigen presentation by HLA-II molecules. We have shown that “endogenous” AAPC^{DR1} expressing HA peptide in the endoplasmic reticulum (ER) or HA protein at the plasma membrane had the best antigen presentation abilities. In a first stimulation, both AAPC^{DR1} cell lines activated HA-specific CD4⁺ TLs, but to a lower extent than autologous APCs. However, in a second stimulation, AAPC^{DR1} expressing HA peptide in the ER were even more effective for amplifying functional specific CD4⁺ TLs than AAPC^{DR1} or autologous APCs loaded with the peptide of interest. Obtained TLs were memory Th1 cells expressing granzyme B and producing IFN- γ and TNF- α .

This is the first time to our knowledge that an antigen expressed endogenously in a cell line can be efficiently presented on an HLA class II molecule. Our “endogenous” AAPCs represent therefore a new and unique tool for reproducible and standardizable generation of specific CD4⁺ T responses, and could lead to the development of new ACI approaches.

Key words: CD4⁺ T lymphocytes, antigen presentation, artificial antigen presenting cells, immunotherapy

INTRODUCTION

Chapitre I – Ontogénie, différenciation et fonctions des LT CD4⁺

- **Rôle du système immunitaire contre le développement des cancers**

Depuis maintenant plus d'un siècle, il est clairement établi que le SI (Système Immunitaire) joue un rôle essentiel dans le développement et le contrôle des tumeurs. Initialement proposé par Paul Erlich en 1909, le concept d'immunosurveillance des tumeurs n'a été repris que près de 50 ans plus tard par Sir MacFarlane Burnet et Lewis Thomas. Dans les années 1980, la découverte du TCR (*T-Cell Receptor*) a permis une meilleure compréhension de la biologie des LT (Lymphocytes T), acteurs majeurs de cette réponse anti-tumorale, permettant ainsi une meilleure compréhension de ce concept (Hedrick *et al.*, 1984). Peu de temps après, les travaux de Steven Rosenberg, un des pionniers de l'immunothérapie moderne, ont permis d'apporter les premières preuves expérimentales concrètes de l'implication du SI dans l'élimination des tumeurs grâce aux travaux de son équipe chez la souris mais surtout à travers des essais cliniques chez l'homme (Spiess *et al.*, 1987; Rosenberg *et al.*, 1988). De manière concomitante, des antigènes de tumeur reconnus par les LT ont été identifiés (van der Bruggen *et al.*, 1991).

Il a été démontré que l'incidence des cancers était plus élevée chez des personnes immunodéficientes ou traitées par immunosuppresseurs que chez des personnes immunocompétentes (Dunn *et al.*, 2004). L'immunosurveillance correspond à la reconnaissance des cellules cancéreuses par les cellules du SI inné puis à leur élimination par les cellules du SI inné et adaptatif, via l'action de LT spécifiques d'antigènes de tumeur (*cf* chapitre IV, section B). Néanmoins, des personnes immunocompétentes peuvent développer des cancers, suggérant que le concept d'immunosurveillance des tumeurs ne permet pas, à lui seul, de caractériser précisément la réponse du SI. En effet, ce concept fait, en réalité, partie intégrante du concept plus général d'*immunoediting*, dans lequel le SI exerce une pression de sélection sur la tumeur. L'*immunoediting* est composé de trois phases : (i) la phase d'immunosurveillance, (ii) la phase d'équilibre, dans laquelle toutes les cellules tumorales ne sont pas détruites par le SI et (iii) la phase d'échappement des cellules tumorales qui aboutit à la croissance tumorale (Dunn *et al.*, 2004).

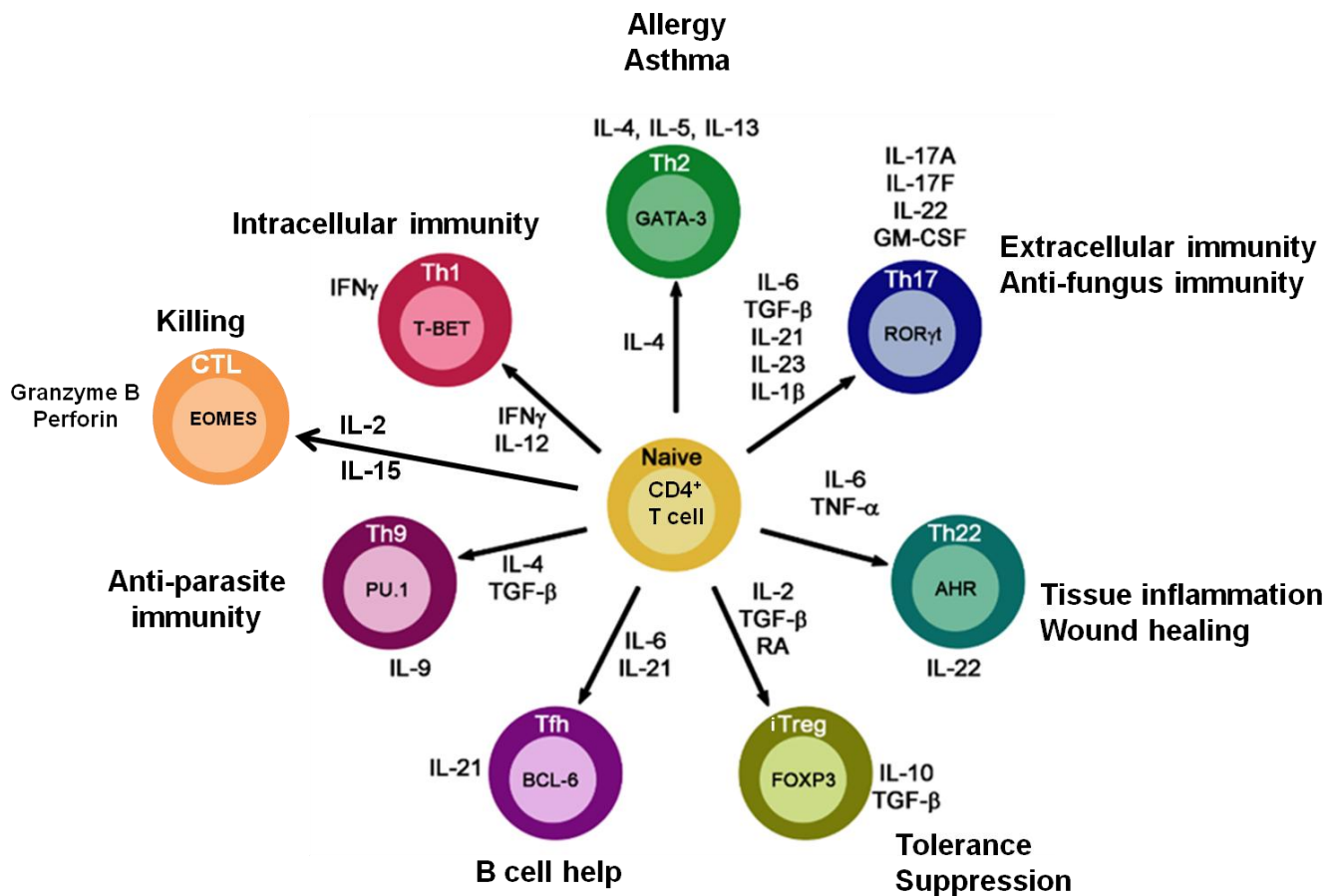
Plus récemment, il a été proposé par Jérôme Galon et Franck Pagès un nouvel outil permettant une évaluation quantitative de la réponse immunitaire au cours des cancers : l'*Immunoscore*. Cet outil a été développé à partir d'une analyse des LT dans la tumeur (TIL, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*), suggérant que les TIL $CD3^+/CD8^+$ seraient un très bon indicateur du pronostic concernant la survie globale du patient. En effet, en utilisant des grandes cohortes de patients atteints de cancer colorectal, ils ont démontré qu'une forte densité de ces TIL était associée à un meilleur pronostic (Galon *et al.*, 2006). A partir du nombre de cellules immunitaires $CD3^+/CD8^+$ infiltrant la tumeur, un score clinique, appelé *Immunoscore*, a été mis au point pour permettre de classer les différents stades évolutifs de la tumeur. L'*Immunoscore* vient en complément de la classification TNM (T, tumeur primitive ; N, ganglion lymphatique (*node*) ; M, métastase) afin d'assurer une meilleure caractérisation des tumeurs permettant ainsi l'optimisation de la prise en charge des patients (Galon *et al.*, 2012, 2017). Cette méthode de classification a été récemment approuvée par l'ensemble des membres de la communauté scientifique internationale pour la classification des cancers colorectaux (Pagès *et al.*, 2018).

En raison de son rôle majeur dans la réponse anti-tumorale, le SI fait désormais partie intégrante des nouveaux critères à prendre en compte dans la biologie des cancers, les « *hallmarks of cancer* » (Hanahan & Weinberg, 2011). Des thérapies anti-cancéreuses basées sur l'utilisation du SI ont donc été développées, communément appelées immunothérapies anti-tumorales. De plus, pour preuve de leur efficacité, l'une d'entre elles basée sur l'inhibition de molécules régulant négativement la réponse adaptative a fait l'objet du prix Nobel de Physiologie-Médecine 2018, décerné aux Professeurs James Allison et Tasuku Honjo.

A- Ontogénie des LT CD4⁺ : sélection thymique et génération des LT naïfs

Les LT sont issus de progéniteurs ayant pour origine la moelle osseuse, qui vont ensuite rejoindre le thymus où ils vont progressivement se différencier et acquérir un TCR fonctionnel, capable de reconnaître des antigènes étrangers sans réagir contre les antigènes du soi. Il existe deux types de TCR, le TCR $\alpha\beta$, le plus fréquent et qui est exprimé par les LT $\alpha\beta$, et le TCR $\gamma\delta$, exprimé par les LT $\gamma\delta$. Brièvement, en ce qui concerne le TCR $\alpha\beta$, celui-ci est formé par l'association d'une chaîne α et d'une chaîne β qui sont reliées entre elles par un pont di-sulfure. Ces chaînes possèdent toutes deux une région constante, proche de la membrane plasmique, et une région distale variable. Il est important de noter qu'au cours de la maturation des cellules T dans le thymus, les gènes codant ces régions variables, et plus précisément certains fragments de gènes, vont subir des processus de réarrangement et d'assemblage : c'est la recombinaison V(D)J (*Variable, (D)iversity, Joining*). Ces réarrangements géniques, aléatoires, impliquent notamment les enzymes RAG-1 et RAG-2 (*Recombination Activating Gene*), et vont participer à la diversité considérable du répertoire T, capable de reconnaître une multitude d'antigènes étrangers (Ebert *et al.*, 2015; Laydon *et al.*, 2015). Concernant ces régions variables, l'hyper-variabilité est particulièrement localisée sur trois domaines, appelés CDR 1, 2 et 3 (*Complementarity-Determining Region*). La molécule du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) est reconnue par les domaines CDR1 et CDR2 tandis que le domaine CDR3, étant le domaine le plus variable, permet la reconnaissance de l'antigène.

Lors de l'acquisition du TCR, les thymocytes immatures et les LT double négatifs vont également acquérir l'expression des molécules CD4 et CD8. Ces cellules sont appelées lymphocytes double positifs. Au cours de leur maturation, les LT vont majoritairement conserver l'expression d'un seul co-récepteur, devenant ainsi des LT appelés simple positifs. Dans le thymus, cette maturation des cellules T se fait *via* deux grands processus biologiques : la sélection positive et la sélection négative. La sélection positive repose sur la capacité des LT à reconnaître les complexes CMH/peptide du soi avec une affinité suffisante. Les LT reconnaissant les molécules du CMH de classe I (CMH-I) exprimeront le co-récepteur CD8 alors que les LT reconnaissant les molécules du CMH de classe II (CMH-II) exprimeront le co-récepteur CD4.



D'après Banuelos & Lu, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2016

Figure 1 : Voies de différenciation des sous-populations de LT CD4⁺

Il y a deux grandes catégories de LT CD4⁺ : les LT effecteurs et les LT régulateurs. Des cytokines sont impliquées dans la différenciation des LT naïfs. Les sous-populations de LT CD4⁺ expriment un facteur de transcription qui leur est propre, sécrètent des cytokines effectrices et possèdent des fonctions immunitaires spécifiques. Les LT CD4⁺ effecteurs sont composés des cellules auxiliaires Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh et des LT CD4⁺ cytotoxiques. Les LT CD4⁺ régulateurs comptent notamment parmi eux les cellules Treg induites. RA: *Retinoic Acid*, CTL: *Cytotoxic T Lymphocyte*.

Ces co-récepteurs ont notamment pour rôle de stabiliser l'interaction entre les complexes CMH/peptide et les TCR. Durant cette phase de sélection positive, les LT ne reconnaissant pas les complexes CMH (du soi)/peptide, ou ceux possédant une affinité trop faible, seront éliminés par apoptose. Les cellules ayant survécu à cette première phase de sélection vont ensuite subir une seconde phase de sélection négative dans laquelle les LT présentant une trop forte affinité vis-à-vis des antigènes du soi seront éliminés. La sélection négative évite la libération de LT auto-réactifs dans la circulation, pouvant entraîner des maladies auto-immunes (Takaba & Takayanagi, 2017). Au final, on considère que moins de 5% des thymocytes initiaux rempliront les critères de sélection pour constituer les LT naïfs. Ces LT naïfs vont ensuite quitter le thymus pour rejoindre la périphérie et circuleront entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires, où en interagissant avec des CPA (Cellules Présentatrices d'Antigène) professionnelles, telles que les DC (*Dendritic Cells*), ils recevront les signaux nécessaires pour devenir des LT activés.

B- Les LT CD4⁺

1) Les LT CD4⁺ effecteurs

Il existe plusieurs sous-populations de LT CD4⁺ effectrices appelées cellules Th (*helper T cells*). La nature de l'antigène reconnu et les cytokines de l'environnement contrôlent la différenciation des différents lignages T CD4⁺. Ils sont caractérisés par un programme transcriptionnel, par l'expression de marqueurs phénotypiques et par la sécrétion de cytokines effectrices (**Figure 1**).

a) Cas particulier des LT double positifs et les LT double négatifs

Certaines populations de LT doubles positif (CD8⁺/CD4⁺) sont retrouvées en périphérie. En conditions physiologiques, elles représentent 1 à 2% des LT circulants. Une augmentation de cette fréquence a été rapportée dans certains cancers, tels que les mélanomes, les cancers du sein, mais aussi dans les cancers colorectaux (Desfrancois *et al.*, 2009, 2010; Sarabayrouse *et al.*, 2011). Le rôle précis de ces cellules n'est pas encore entièrement caractérisé à l'heure actuelle, mais elles ont déjà été décrites comme des cellules activées présentant un phénotype de LT mémoires effecteurs (Nascimbeni *et al.*, 2004, 2011).

En revanche, elles ont également été décrites comme possédant des propriétés régulatrices (Szczepanik *et al.*, 2005), même si des études récentes tendent plutôt à confirmer le phénotype mémoire et la fonction anti-tumorale de ces LT CD8⁺/CD4⁺ se trouvant en périphérie (Parrot *et al.*, 2016; Clénet *et al.*, 2017).

Des LT double négatifs (CD8⁻/CD4⁻) sont aussi retrouvés en périphérie. Ils constituent près de 1% des LT circulants (Fischer *et al.*, 2005). Ces cellules ont été historiquement associées aux syndromes lymphoprolifératifs chez la souris et chez l'homme (Martina *et al.*, 2015). Selon les données de la littérature, leur fonction reste mal caractérisée. Dans les mélanomes, des études confèrent à ces cellules un rôle pro-tumoral alors que d'autres leur confèrent un rôle anti-tumoral. Des LT double négatifs régulateurs, à activité suppressive, spécifiques de l'antigène de tumeur Melan-A/MART-1 (*Melanoma Antigen Recognized by T cells-1*) ont déjà été décrits (Fischer *et al.*, 2005). En revanche, des LT CD8⁻/CD4⁻ spécifiques de l'antigène gp100 (*glycoprotein 100*) ont aussi été identifiés chez un patient atteint de mélanome et ces cellules circulantes contribuaient directement à la réponse immunitaire anti-tumorale (Voelkl *et al.*, 2009).

b) Les lymphocytes Th1

L'IFN- γ (InterFéron- γ) et l'IL-12 (InterLeukine-12) vont orienter la différenciation du LT naïf vers un profil Th1. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription T-bet (*T-box expressed in T cells*) et par la production de molécules pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*). L'IFN- γ possède une activité anti-tumorale directe. Il permet de limiter l'angiogenèse tumorale, d'augmenter l'expression des molécules du CMH à la surface des tumeurs et d'activer les cellules NK, *Natural Killer* (Bruno *et al.*, 2014; Burkholder *et al.*, 2014; Kennedy and Celis, 2008). Les Th1 sont principalement impliqués dans l'élimination des pathogènes intracellulaires via l'activation des macrophages (Charles A Janeway *et al.*, 2001). De plus, ils soutiennent l'activation et l'amplification des LT CD8⁺ en contribuant à la maturation des DC, comme décrit dans l'introduction du chapitre IV (Smith *et al.*, 2004). Ceci se fait notamment via leur capacité à augmenter l'expression de certaines molécules de costimulation (CD80, CD86) à la surface des DC (Bourgeois *et al.*, 2002). Dans le cadre des cancers colorectaux, il a été mis en évidence que la présence d'un infiltrat riche en lymphocytes Th1 était associée à un meilleur pronostic (Tosolini *et al.*, 2011).

c) Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2, principalement induits par l'IL-4, sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription GATA-3 (*GATA binding protein-3*) et par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Ils contribuent à la réponse immunitaire contre les pathogènes extracellulaires, dont principalement les helminthes, en activant les éosinophiles. Ils sont aussi associés aux mécanismes physiopathologiques des allergies et de l'asthme. L'IL-4 qu'ils produisent est un facteur de survie pour les cellules lymphocytaires B (Snapper *et al.*, 1988; Steinke & Borish, 2001). Via la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13, les lymphocytes Th2 sont capables d'inhiber la différenciation des cellules Th1 et Th17. De ce fait, les cellules Th2 sont plutôt décrites comme favorisant la croissance tumorale (Terabe *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008). Pour échapper à l'action du SI, un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur des cellules Th2 est souvent observé au niveau des tumeurs (Agarwal *et al.*, 2012). De plus, une prédominance de cellules Th2 dans la tumeur pourrait faciliter la génération de cellules myéloïdes suppressives (MDSC, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) et ainsi participer à la croissance tumorale (Gabitass *et al.*, 2011).

d) Les lymphocytes Th9

L'IL-4 et le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) participent à la différenciation des LT naïfs en cellules Th9. Ces cellules expriment le facteur de transcription PU.1 et sécrètent principalement de l'IL-9. Il a été démontré que les cellules Th9 pouvaient provenir de cellules Th2 reprogrammées en présence de TGF- β (Veldhoen *et al.*, 2008). Ils ont été initialement décrits pour leur participation à la réponse immunitaire anti-parasitaire en induisant la production de mucus et en activant les mastocytes et les éosinophiles (Kaplan *et al.*, 2015). Dans le cadre des cancers, leur action est assez controversée. Des études menées chez la souris et chez l'homme ont montré que l'IL-9 pouvait favoriser le développement de lymphomes (Renauld *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 2003). En effet, cette cytokine a été rapportée comme augmentant les fonctions immunosuppressives des Treg (Lymphocytes T régulateurs) et dans un modèle murin de lymphome, la neutralisation de cette dernière entraînait une inhibition de la croissance tumorale associée à une diminution du nombre de Treg (Feng *et al.*, 2011). Cependant, des investigations assez récentes leur confèrent des propriétés anti-tumorales (Végran *et al.*, 2015).

Purwar et ses collaborateurs ont démontré dans un modèle murin de mélanome, que les souris déficientes pour le récepteur à l'IL9 possédaient une croissance tumorale accélérée, et que l'injection d'IL-9 recombinante inhibait la progression tumorale (Purwar *et al.*, 2012). Chez la souris, il a été mis en évidence que les lymphocytes Th9 étaient capables de recruter et d'activer des DC CD8 α^+ spécialisées dans la présentation croisée des antigènes (*cf* introduction du chapitre II), et l'activation des LT CD8 $^+$ anti-tumoraux (Lu & Yi, 2013). Dans un modèle murin, il a été montré qu'un transfert adoptif de cellules Th9 spécifiques d'antigènes tumoraux permettait d'éradiquer les tumeurs greffées et permettait de protéger les animaux contre une nouvelle inoculation de cellules tumorales (Lu *et al.*, 2018). Il a aussi été démontré que les cellules Th9 possédaient à la fois une forte activité cytolytique anti-tumorale, comme les cellules Th1, mais aussi une capacité de prolifération et de survie aussi importante que les cellules Th17 anti-tumorales possédant un phénotype très peu différencié (*stem-cell like*). Ces cellules possèdent donc un potentiel anti-tumoral très important, et leur implication en thérapeutique fait actuellement l'objet de nombreuses études (Rivera Vargas *et al.*, 2017).

e) Les lymphocytes Th17

Plusieurs molécules sont impliquées dans la différenciation du LT naïf en lymphocyte Th17. Cependant, il existe une différence entre la souris et l'homme concernant les cytokines induisant la polarisation des cellules Th17. Chez la souris, le TGF- β et l'IL-6 sont les cytokines les plus importantes dans la différenciation des cellules Th17 alors que chez l'homme cette différenciation est principalement médiée par l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-23 (Annunziato *et al.*, 2009). Ces cellules sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription ROR γ t (*Retinoic acid receptor-related ORphan receptor γ restricted to the thymus*), ainsi que par la production de cytokines incluant l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22 et le GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*). Ces cellules jouent un rôle important dans l'élimination des bactéries extracellulaires et des champignons. Elles sont fortement impliquées dans le développement des pathologies auto-immunes (Korn *et al.*, 2009; Waite & Skokos, 2012). Dans le cadre des réponses immunitaires anti-tumorales, leur rôle est très controversé (Martin *et al.*, 2012).

Des cellules Th17 infiltrant les tumeurs ont déjà été retrouvées dans plusieurs types de cancers tels que les mélanomes, les cancers du foie, du colon, de l'ovaire, du pancréas, de la prostate mais également dans les tumeurs rénales (Zou & Restifo, 2010). A titre d'exemple, la présence d'un infiltrat Th17 dans les tumeurs colorectales est de mauvais pronostic (Tosolini *et al.*, 2011) alors que celui-ci est positivement corrélé à la survie des patients dans le cadre des cancers de l'ovaire et des cancers de la prostate (Sfanos *et al.*, 2008; Kryczek *et al.*, 2009). De plus, chez la souris, des LT_{SCM} (*Stem Cell-like Memory T cells*) présentant un profil Th17 et possédant une capacité anti-tumorale ont été identifiés *in vivo* (Muranski *et al.*, 2011; Luckey & Weaver, 2012). Les cellules Th17 sont douées d'une grande plasticité et elles peuvent se différencier, en fonction de leur microenvironnement, en cellules Th1 ou en cellules Treg (Zhou *et al.*, 2008; Muranski & Restifo, 2013). Ceci peut en partie expliquer les diverses fonctions parfois opposées qui ont été décrites à leur sujet, notamment dans un contexte tumoral (Guéry & Hugues, 2015).

f) Les lymphocytes Tfh

Les lymphocytes Tfh (*follicular helper T cells*), également connus sous le nom de Th21, sont induits par l'IL-6 et l'IL-21. Ces cellules expriment le facteur de transcription Bcl-6 (*B cell lymphoma-6*), sécrètent principalement de l'IL-21, et expriment les marqueurs membranaires PD-1 (*Programmed Death-1*), ICOS (*Inducible COStimulatory molecule*) et CXCR5 (Kerfoot *et al.*, 2011). Ce récepteur aux chimiokines leur permet de migrer au niveau des centres germinatifs où ils vont interagir avec les LB. Ils sont impliqués dans la différenciation des LB (Lymphocytes B) mémoires et des plasmocytes. Les cellules Tfh, notamment *via* la production d'IL-21, participent aux processus de commutation isotypique des Ig (Immunoglobulines), d'hypermutation somatique de leur gènes, et de maturation de leur l'affinité (Zhang *et al.*, 2013; Ueno *et al.*, 2015). Cette sous-population de LT peut également avoir un rôle important dans les cancers. En effet, il a été rapporté qu'un infiltrat immunitaire riche en cellules Tfh dans les cancers du sein était associé à une meilleure survie des patientes (Gu-Trantien *et al.*, 2013). De même, un infiltrat immunitaire riche en lymphocytes Tfh est également de bon pronostic dans les cancers colorectaux, où il est positivement corrélé à une meilleure survie des patients (Bindea *et al.*, 2013). L'IL-21 permet d'augmenter la production d'IFN- γ par les cellules NK et par les LT CD8⁺, et promeut ainsi une réponse anti-tumorale (Végran *et al.*, 2014).

En revanche, une augmentation du nombre de lymphocytes Tfh a aussi été identifiée chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (Cha *et al.*, 2013). *In vitro*, il a été mis en évidence que l'IL-21 favoriserait la prolifération des cellules leucémiques et participerait ainsi à la progression de la pathologie (Ahearne *et al.*, 2013).

g) Les lymphocytes Th22

Les lymphocytes Th22 représentent une autre sous-population de LT CD4⁺ effecteurs, récemment décrite et moins bien caractérisée (Eyerich *et al.*, 2009). La différenciation des LT CD4⁺ naïfs en cellules Th22 est médiée par l'IL-6 et le TNF- α . Elles sont connues pour exprimer le facteur de transcription AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) et pour sécréter, entre autres, de l'IL-22 et du TNF- α . Ces cellules sont principalement impliquées dans les processus d'inflammation tissulaire et de cicatrisation localisés au niveau de la peau. Pour migrer à cet endroit de l'organisme, elles expriment à leur surface les molécules CCR4 et CCR10 (Fujita, 2013; Azizi *et al.*, 2015). Ces cellules semblent également activement contribuer à la physiopathologie des maladies allergiques des voies respiratoires telles que l'asthme allergique (Tamasauskiene & Sitkauskiene, 2018). Dans les cancers, le rôle des lymphocytes Th22 est de plus en plus étudié et, actuellement, ces cellules sont associées à des fonctions pro-tumorales. En effet, il a été mis en évidence que le nombre de cellules Th22 circulantes était plus élevé et corrélé avec un taux sérique d'IL-22 plus important chez des patients présentant un carcinome hépatocellulaire (Qin *et al.*, 2014). De plus, ces deux biomarqueurs sont également positivement corrélés avec les stades d'évolution de la maladie. De même, dans les cancers gastriques, il a été mis en évidence qu'un infiltrat immunitaire enrichi en cellules Th22 était corrélé avec la progression de la pathologie et une moins bonne survie des patients (Zhuang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015). Des effets pro-tumoraux ont aussi été associés à ces cellules dans d'autres types de cancers tels que le myélome multiple (Di Lullo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015) et les cancers épithéliaux ovariens (Wang *et al.*, 2017).

h) Les lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques

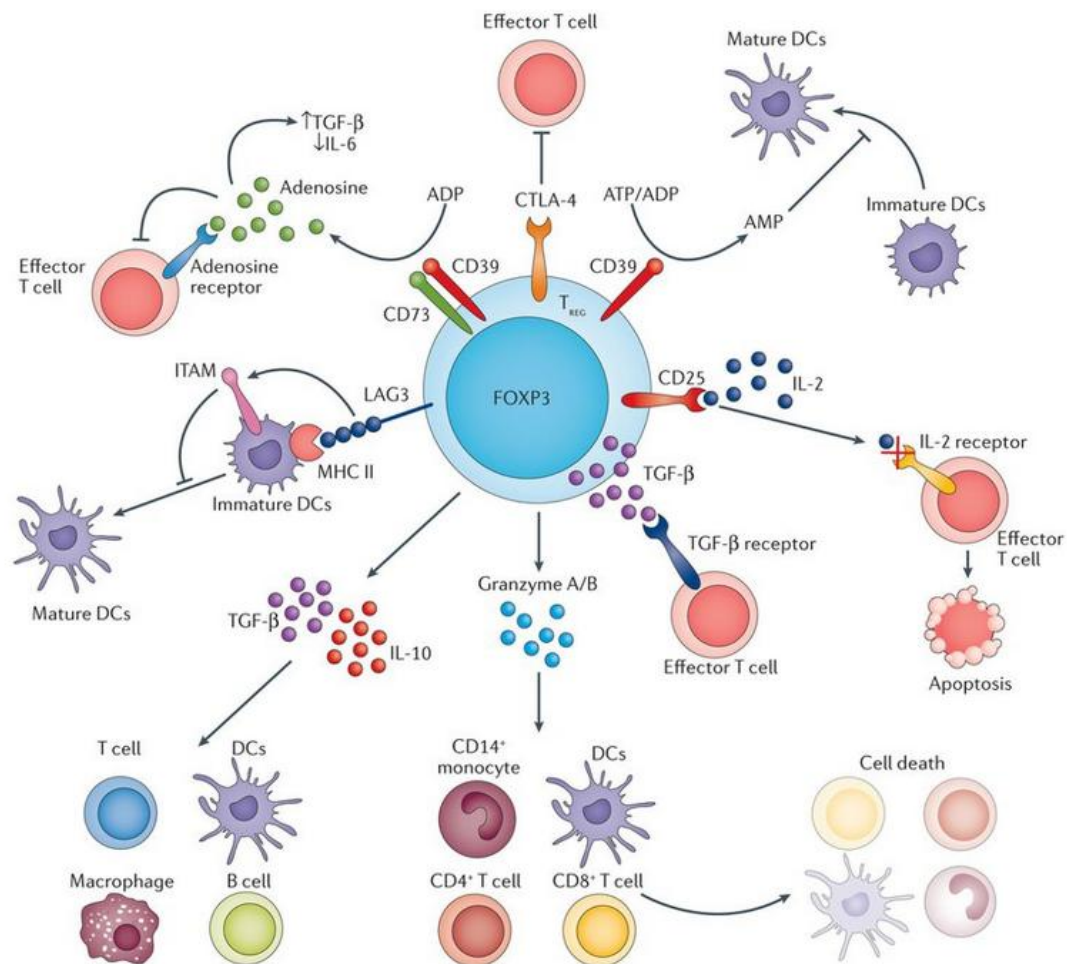
On recense également une sous-population de LT CD4⁺ effecteurs, qui possède des capacités de lyse cellulaire directe : les LT CD4⁺ cytotoxiques. Ces cellules sont induites par l'IL-2 et l'IL-15 et sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription Eomes (*Eomesodermin*). Comme les LTC (Lymphocytes T Cytotoxiques) CD8⁺, elles expriment aussi des perforines et des granzymes B, qui vont respectivement créer des pores dans la membrane des cellules cibles et activer la voie des caspases dans ces cellules pour initier l'apoptose (Juno *et al.*, 2017). Pour induire la mort cellulaire de la cible, ces cellules peuvent également utiliser le mécanisme de cytotoxicité médié par l'interaction Fas/FasL (*Fas Ligand*). Ces LT CD4⁺ cytotoxiques sont également caractérisés par l'expression de certains marqueurs tels que les molécules NKG2A et NKG2D (*Natural Killer Group 2, A et D*) et CRTAM (*Class I-Restricted T cell Associated Molecule*) comme l'ont décrit Takeuchi et Saito (Takeuchi & Saito, 2017). Les LT CD4⁺ cytotoxiques sont principalement localisés dans les tissus périphériques et possèdent une forte activité anti-virale (Marshall & Swain, 2011; Juno *et al.*, 2017). Dans le cadre des cancers, de par leur capacité à lyser des cellules cibles de façon spécifique, ces cellules possèdent de forts potentiels thérapeutiques (Martorelli *et al.*, 2010). Leur efficacité a notamment été prouvée chez la souris et chez l'homme pour traiter les mélanomes (Quezada *et al.*, 2010; Kitano *et al.*, 2013). Toutefois, ils auraient un rôle délétère dans le cadre des maladies auto-immunes du fait de leur implication dans le développement et la progression de ces maladies (van de Berg *et al.*, 2008).

2) Les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs

Les lymphocytes Treg ont initialement été mis en évidence par l'équipe de Shimon Sakaguchi comme étant une sous-population de cellules CD4⁺ exprimant fortement la molécule CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2). Dans des modèles murins immunodéficients, cette équipe a démontré que le transfert de cellules CD4⁺/CD25⁻ conduisait à l'apparition de multiples maladies auto-immunes et qu'un transfert additionnel de cellules CD4⁺/CD25⁺ prévenait la survenue de ces pathologies (Sakaguchi *et al.*, 1995).

Par la suite, le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead box P3*) a été identifié comme étant nécessaire à la différenciation et au maintien de la fonctionnalité des cellules Treg. En effet, la mutation du gène *FoxP3* chez la souris (*Scurfy*) induit une réponse immunitaire non régulée, caractérisée par un syndrome lymphoprolifératif et une inflammation majeure entraînant une défaillance multi-viscérale létale (Brunkow *et al.*, 2001). Chez l'homme, les mutations de ce gène aboutissent au syndrome IPEX (*Immunodysregulation, Polyendocrinopathy and Enteropathy, X-linked*), qui est également fatal en l'absence de greffe de cellules souches hématopoïétiques (Bennett *et al.*, 2001; Hori *et al.*, 2003). Il a aussi été démontré, chez l'homme, que l'expression de la molécule CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL-7) était inversement corrélée à l'expression de FoxP3 (Liu *et al.*, 2006). Ainsi, les cellules Treg sont principalement caractérisées par un phénotype $CD4^+$, $CD25^+$ (ou *CD25 high*), $FoxP3^+$ et $CD127^-$ (ou *CD127 low*).

En fonction de l'expression de FoxP3, on peut différencier deux grandes catégories de cellules Treg (Abbas *et al.*, 2013). Les cellules $FoxP3^+$ regroupent les tTreg (*thymus-derived Treg cells*), aussi appelées nTreg (*natural Treg cells*), qui sont produits dans le thymus et les pTreg (*peripheral Treg cells*), qui eux, sont induits en périphérie après avoir rencontré l'antigène. Lorsqu'elles sont générées *in vitro*, ces cellules sont dénommées iTreg (*induced Treg cells*). Il existe également des cellules régulatrices $FoxP3^-$, les cellules T régulatrices de type 1 (*type 1 regulatory T cells*), appelées cellules Tr1. Ces cellules, participant à la tolérance périphérique, sont caractérisées par la co-expression des molécules LAG-3 (*Lymphocyte Activation Gene-3*) et la sous-unité de l'intégrine $\alpha 2$, CD49b (Gagliani *et al.*, 2013). Elles sécrètent aussi de l'IL-10 et du TFG- β , et possèdent les mêmes mécanismes de suppression que les Treg $FoxP3^+$ (Zeng *et al.*, 2015). Très récemment, des cellules T régulatrices folliculaires (Tfr, *follicular regulatory T cells*) ont été identifiées. Ces cellules ont la capacité de migrer au niveau des centres germinatifs pour réguler l'aide que les cellules Tfh apportent à la réponse lymphocytaire B et à la production d'anticorps (Sage & Sharpe, 2016). Ces cellules expriment les molécules immuno-régulatrices TIGIT (*T cell immunoreceptor with ImmunoGlobulin and ITim domains*) et GATR (*Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*) et elles expriment également FoxP3, CXCR5, CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), PD-1 et ICOS (Xie & Dent, 2018).



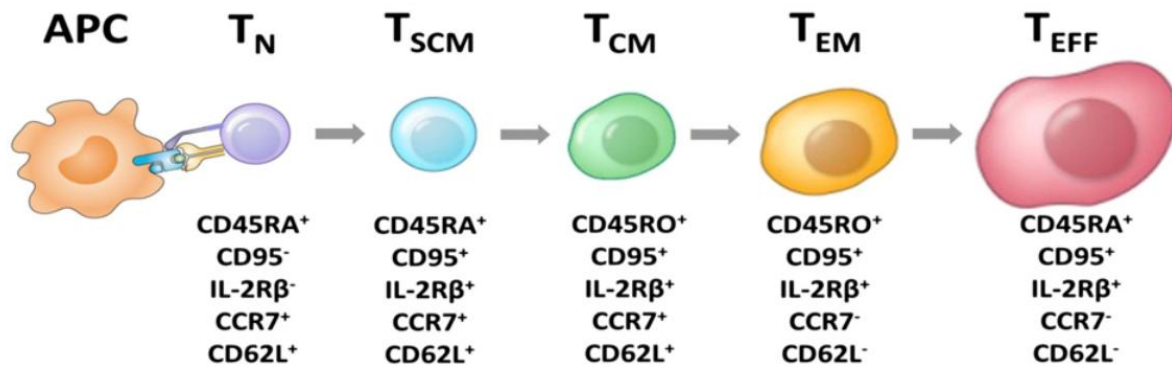
Meng et al., *Nature Review Cardiology*, 2016

Figure 2 : Mécanismes de suppression médiés par les Treg

Les Treg disposent de plusieurs mécanismes de suppression. Certains mécanismes ne requièrent pas de contact avec la cellule effectrice : production de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF-β), privation en IL-2 mais aussi en ATP (Adénosine TriPhosphate) et en ADP (Adénosine DiPhosphate). D'autres mécanismes de suppression tels que l'expression de molécules immuno-régulatrices (CTLA-4, LAG-3) et la lyse des cellules effectrices *via* la production des granzymes A et B, requièrent quant à eux un contact cellulaire. MHC: *Major Histocompatibility Complex*.

Les mécanismes d'immunosuppression des Treg sont divisés en deux groupes : l'un indépendant d'un contact cellulaire et l'autre nécessitant un contact cellulaire avec les effecteurs (**Figure 2**). Dans le premier cas, les cellules Treg peuvent inhiber les fonctions effectrices des cellules immunitaires (LT, LB, DC...) en sécrétant des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β et IL-35). *Via* une forte expression de la molécule CD25 à leur surface, elles peuvent également séquestrer l'IL-2 qui est nécessaire à la différenciation et à la prolifération des cellules T effectrices. Elles peuvent également participer à la production d'AMP (Adénosine MonoPhosphate), qui va inhiber la maturation des DC et donc, *a fortiori*, inhiber l'activation des LT effecteurs. Les mécanismes d'immunosuppression ayant recourt à un contact cellulaire incluent notamment l'interaction de la molécule CTLA-4 avec ses ligands CD80 et CD86, exprimés par les CPA, pour réprimer les signaux de costimulation transmis aux LT effecteurs. Cette suppression peut aussi impliquer une interaction de la molécule LAG-3, exprimée par les Treg, avec les molécules du CMH-II exprimées par les DC. Cette interaction, *via* une voie de signalisation inhibitrice médiée par un motif ITAM (*Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif*) dans les DC, va contribuer à l'inhibition de la maturation de ces dernières et donc inhiber leur capacité à activer des LT effecteurs (Liang *et al.*, 2008). De plus, de par leur capacité à produire des granzymes (A et B), les Treg peuvent également contribuer à la lyse des cellules immunitaires effectrices.

En participant aux mécanisme de tolérance vis-à-vis des antigènes du soi, les Treg ont notamment un rôle fondamental pour prévenir l'apparition de maladies auto-immunes (Lindley *et al.*, 2005; Dominguez-Villar & Hafler, 2018). Au vu de leurs fonctions, dans le cadre des cancers, ces cellules sont très généralement associées à des effets pro-tumoraux. A titre d'exemple, dans les cancers du sein ou de l'ovaire, il a déjà été montré qu'un infiltrat riche en cellules Treg était de mauvais pronostic pour la survie des patientes (Curiel *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2017). Dans les cancers colorectaux, deux études ont rapporté des données contradictoires quant au lien entre l'infiltrat en cellules Treg et la survie des patients (Salama *et al.*, 2009; Sinicrope *et al.*, 2009). Dans le cas particulier des cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire, notre équipe a mis en évidence qu'un fort infiltrat en cellules FoxP3⁺ était associé à des formes moins invasives (Tougeron *et al.*, 2013). Il faut néanmoins rester prudent dans l'interprétation de ces données car le marqueur FoxP3 peut être transitoirement exprimé par les LT activés (Wang *et al.*, 2007, p. 3).



D'après Restifo, *Blood*, 2014

Figure 3 : Phénotype des principales sous-populations de LT mémoires

Après avoir été activés par les CPA, les LT naïfs (T_N , *Naïve T cells*) vont pouvoir se différencier en différentes sous-populations de LT mémoires. Six marqueurs de surface permettent de différencier les sous-populations de LT mémoires : CD45RA, CD45RO, CD95 (Fas), IL-2R β (chaîne β du récepteur à l'IL-2, CD122), CCR7 (*C-C chemokine Receptor type 7*) et CD62L. APC: *Antigen Presenting Cell*, T_{EFF} : *Effector T cell*.

C- Les LT mémoires

1) Les sous-populations de LT mémoires

La stimulation des LT naïfs permet leur différenciation en LT effecteurs possédant une survie assez limitée et en LT précurseurs mémoires possédant une survie bien plus importante. Après élimination de la cible de la réponse, la majorité des effecteurs vont mourir par apoptose, c'est la phase de contraction. Une fraction de cellules mémoires va persister. En cas de réexposition à l'antigène, ces cellules permettront au SI de réagir de façon plus efficace et plus rapide. Ces LT mémoires représentent une population hétérogène caractérisée par l'expression de plusieurs marqueurs membranaires ou intracellulaires. On distingue plusieurs sous-populations de LT mémoires : les LT mémoires souches (T_{SCM}), les LT mémoires centraux (T_{CM} , *Central Memory T cells*), les LT mémoires transitionnels (T_{TM} , *Transitional Memory T cells*), les LT mémoires effecteurs (T_{EM} , *Effector Memory T cells*) et les LT mémoires résidents (T_{RM} , *Resident Memory T cells*), décrites par la **Figure 3**.

a) Les LT mémoires souches (T_{SCM})

Les isoformes de la molécule CD45 ont historiquement permis de distinguer les LT naïfs des LT mémoires. En effet, les LT naïfs étaient caractérisés par l'expression de la molécule CD45RA et les LT mémoires par l'expression de la molécule CD45RO. Ensuite, l'expression des molécules de *homing* CCR7 et L-sélectine (CD62L), a contribué à l'identification de deux sous-types de LT mémoires : les LT_{CM} ($CD45RA^-$, $CD45RO^+$, $CD62L^+$ et $CCR7^+$) et les LT_{EM} ($CD45RA^-$, $CD45RO^+$, $CD62L^-$ et $CCR7^-$; (Sallusto *et al.*, 1999). Cependant, chez l'homme, il a été très récemment décrit une nouvelle population de LT mémoires exprimant à la fois les molécules Fas (CD95) et la chaîne β du récepteur à l'IL-2 (CD122) comme les LT_{CM} et les LT_{EM} . Cette population exprime également la molécule CD45RA, initialement présentée comme un bio-marqueur des LT naïfs. Cette sous-population de LT correspond à des LT mémoires très peu différenciés : les LT_{SCM} ($CD45RA^+$, $CD45RO^-$, $CCR7^+$, $CD62L^+$, $CD95^+$ et $CD122^+$). Actuellement, des LT_{SCM} ont été identifiés chez l'homme parmi les populations de LT $CD8^+$ et de LT $CD4^+$ (Gattinoni *et al.*, 2011; Muranski *et al.*, 2011).

Comme pour les LT naïfs dont ils partagent certaines propriétés, la plupart des LT_{SCM} réside dans les organes lymphoïdes secondaires et seulement environ 2% de ces cellules circulent dans le sang périphérique (Lugli *et al.*, 2013). Même si ces cellules ont antérieurement rencontré leur antigène, elles sont douées d'une capacité de prolifération importante, et d'auto-renouvellement, mais possèdent aussi une capacité de différenciation en cellules de phénotypes T_{CM} et T_{EM} (Gattinoni *et al.*, 2011; Klebanoff *et al.*, 2016). De plus, de par une forte expression de la télomérase, elles possèdent une longue durée de vie (Ahmed *et al.*, 2016). Une étude très intéressante a confirmé que les LT_{SCM} pouvaient persister à long terme *in vivo*, après injection chez des patients dans le cadre de greffe de cellules souches hématopoïétiques (Biasco *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015). Dans ces études, les cellules injectées aux patients avaient été préalablement modifiées génétiquement avec un gène suicide (thymidine kinase) et un marqueur de surface (LNGFR, *Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor*), pour permettre un suivi *in vivo*. Il a ainsi été mis en évidence que plus de 10 ans après le traitement, des LT_{SCM} étaient toujours présents chez les patients. De plus, les principaux clonotypes (clones cellulaires différenciés en fonction de la séquence de leur TCR) identifiés parmi les LT mémoires provenaient majoritairement des LT_{SCM} et des LT_{CM} injectés. Ces LT_{SCM} ont donc un potentiel thérapeutique très intéressant et font aujourd'hui l'objet de recherches très actives pour renforcer l'efficacité des immunothérapies cellulaires (Gattinoni & Restifo, 2013).

b) Les LT mémoires centraux (T_{CM})

Les LT_{CM} expriment la molécule CD45RO et non l'isoforme CD45RA comme les LT_{SCM}. Ils sont plus différenciés que les LT_{SCM}, mais comme ces derniers, ils expriment également les molécules CCR7 et CD62L qui leur permettent de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, où ils pourront être plus facilement réexposés à l'antigène. Cette réexposition engendre une prolifération rapide des LT_{CM}, mais avec un potentiel prolifératif moindre que les LT_{SCM}. Elle entraîne également leur renouvellement et leur différenciation en LT_{EM} et en LT effecteurs (Messi *et al.*, 2003). Il a été rapporté que les T_{CM} pouvaient posséder une capacité d'auto-renouvellement et donc, comme les T_{SCM}, ces cellules pourraient représenter une option thérapeutique très intéressante en immunothérapie cellulaire *via* leur grande durée d'action, notamment dans le cadre des cancers (Turtle *et al.*, 2009).

Des modèles murins ont déjà illustré le fait qu'un transfert adoptif de LT_{CM} conférait, *in vivo*, une réponse anti-tumorale plus efficace que celle obtenue avec un transfert adoptif de LT_{EM} (Klebanoff *et al.*, 2005).

c) Les LT mémoires transitionnels (T_{TM})

Une population récemment décrite et moins bien caractérisée est celle des LT_{TM}. Ces LT mémoires ont pour le moment été mis en évidence au sein des LT CD4⁺ (Xu *et al.*, 2015). Leur présence a déjà été rapportée chez des sujets sains ainsi que chez des sujets infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Ces LT possèdent des caractéristiques fonctionnelles, transcriptionnelles et phénotypiques intermédiaires entre celles des LT_{CM} et celles des LT_{EM}. Concernant leur phénotype, ces LT_{TM} sont décrits comme CD45RO⁺/CD62L⁺/CCR7⁻ alors que les LT_{CM} et les LT_{EM} sont respectivement de phénotype CD45RO⁺/CD62L⁺/CCR7⁺ et de phénotype CD45RO⁺/CD62L⁻/CCR7⁻ (Riou *et al.*, 2007; Chomont *et al.*, 2009; Flynn *et al.*, 2014; Garnier *et al.*, 2016).

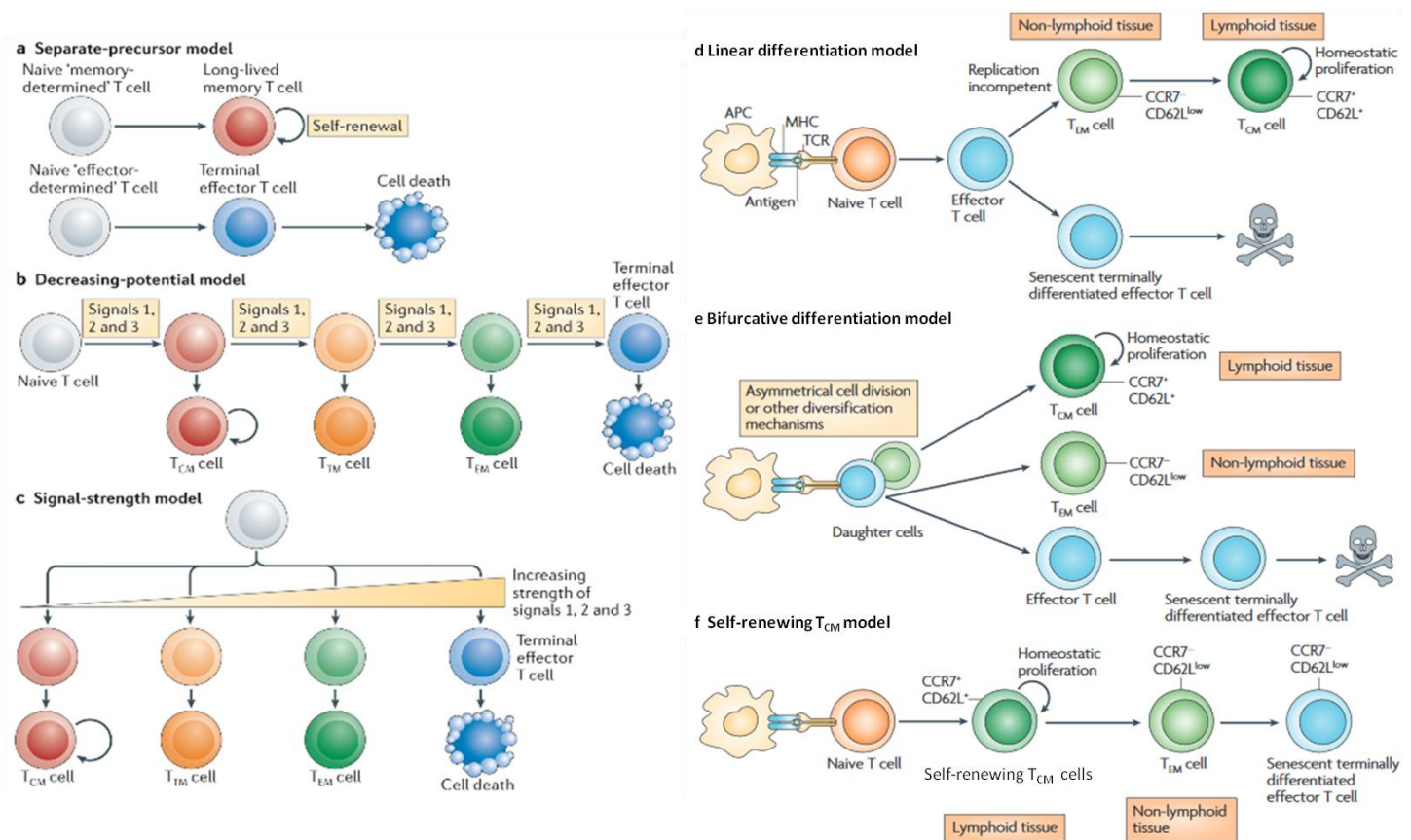
d) Les LT mémoires effecteurs (T_{EM})

Les LT_{EM} diffèrent des LT_{CM} par le fait qu'ils n'expriment pas les molécules CCR7 et CD62L (Sallusto *et al.*, 1999). La perte d'expression de ces deux molécules limite leur capacité de *homing* dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LT_{EM} circulent en permanence dans le sang périphérique et dans les tissus. Cependant, il a aussi été rapporté que certains LT_{EM} pouvaient exprimer la molécule CD45RA. Ces LT, correspondant à des cellules en stade de différenciation terminale, sont communément appelés les LT_{EMRA} (LT_{EM} RA⁺) mais aussi T_{TE} (*Terminal Effector T cells*). Il a été montré que les T_{EM} (CD45RO⁺) possédaient une meilleure capacité d'amplification que les T_{EMRA} (Geginat *et al.*, 2003).

e) Les LT mémoires résidents (T_{RM})

Comme les LT_{TM}, les LT_{RM} constituent une sous-population de LT mémoires récemment identifiée et moins bien caractérisée. Ces LT_{RM} sont des cellules non circulantes qui résident dans les tissus et permettent d'accélérer localement l'élimination des agents pathogènes. Ces cellules sont caractérisées phénotypiquement, principalement par l'expression des molécules CD69 et intégrine $\alpha E\beta 7$, CD103 (Farber *et al.*, 2014). En revanche, de même que les LT_{EM}, elles n'expriment ni la molécule CCR7, ni la molécule CD62L (Schenkel & Masopust, 2014).

Des LT_{RM} ont déjà été retrouvés au sein de la moelle osseuse, de la rate, des ganglions lymphatiques, de la peau, des intestins et des poumons. Ces cellules mémoires possèdent des profils transcriptomiques, phénotypiques, et fonctionnels qui leur sont propres.



D'après Ahmed *et al.*, 2009 et Kaech & Cui, 2012, *Nature Reviews Immunology*

Figure 4 : Modèles de différenciation des cellules T mémoires

a. Modèle des précurseurs séparés : avant son activation, le LT naïf est déjà préprogrammé à devenir un LT effecteur ou un LT mémoire. **b. Modèle à potentiel décroissant** : les LT se différencient en fonction des signaux d'activation qu'ils reçoivent. Une fréquence de stimulation importante entraînera la différenciation des LT vers un phénotype effecteur différencié alors qu'une fréquence de stimulation plus faible favorisera l'induction de cellules mémoires moins différenciées. **c. Modèle dépendant de la force du signal** : la différenciation du LT naïf est contrôlée par l'intensité des signaux d'activation qu'il reçoit. Plus les signaux d'activation seront forts, plus le LT possédera un phénotype mémoire différencié. **d. Modèle de différenciation linéaire** : des cellules effectrices précurseurs mémoires ayant survécu à la phase de contraction vont constituer le *pool* de cellules mémoires. **e. Modèle de division asymétrique** : les cellules effectrices et mémoires sont issues de la division, asymétrique, d'une même cellule mère. **f. Modèle d'auto-renouvellement des T_{CM}** : les T_{CM} maintiennent le *pool* de cellules mémoires en s'auto-renouvelant et en générant les cellules T_{EM}.

2) Différenciation des LT mémoires

Plusieurs modèles de différenciation des LT ont été proposés (**Figure 4**). Parmi eux, les principaux sont le modèle de différenciation linéaire, le modèle à potentiel décroissant, le modèle dépendant de la force du signal de stimulation, le modèle de division asymétrique, le modèle de cellules précurseurs séparées et le modèle de renouvellement des cellules T_{CM} .

Brièvement, le premier modèle, dit de différenciation linéaire, repose sur l'hypothèse que des cellules effectrices précurseurs mémoires (LT_{EM}) survivraient à la phase de contraction des cellules effectrices et persisteraient pour générer, par la suite, un pool de cellules mémoires (Ahmed & Gray, 1996). Le second modèle, appelé modèle à potentiel décroissant, implique les signaux d'activation (signalisation par le TCR, par les molécules de costimulation et par les cytokines, *cf* chapitre II) que reçoit le LT au cours de la réponse immunitaire. Ce modèle suggère qu'une accumulation de signaux de stimulation répétés entraîne la différenciation des LT vers un phénotype T_{TE} alors que des stimulations moins fréquentes permettraient de générer des LT de phénotypes moins différenciés, les LT_{CM} et les LT_{EM} . Il y a donc une différenciation progressive des LT, d'un phénotype mémoire moins différencié vers un phénotype mémoire plus différencié, qui est directement corrélé à la fréquence de stimulation de ces cellules (Lanzavecchia & Sallusto, 2002; Pepper & Jenkins, 2011). Le modèle de différenciation dépendant de la force du signal d'activation repose ici, non pas sur la notion de fréquence, mais directement sur l'intensité des signaux d'activation que va recevoir le LT pour être activé. Selon ce modèle, plus les signaux d'activation seront importants, plus le LT aura un phénotype mémoire différencié (Lanzavecchia & Sallusto, 2002). Le modèle de division asymétrique repose quant à lui sur le fait que les LT effecteurs et les LT mémoires seraient issus d'une même cellule mère. En effet, selon ce postulat, après activation, la cellule mère va subir une division asymétrique pour donner naissance d'une part à une cellule fille effectrice proximale (au contact de la CPA) et d'autre part, à une cellule fille mémoire distale (Kaeck *et al.*, 2002). Un autre modèle reposant sur des cellules T naïves préprogrammées pour devenir des cellules effectrices ou des cellules mémoires a également été proposé, c'est le modèle des précurseurs séparés. Celui-ci met en jeu des LT naïfs initiaux qui, avant stimulation, sont déjà prédéfinis pour devenir des LT effecteurs ou bien des LT mémoires une fois qu'ils auront reçu leurs signaux d'activation (Kaeck & Cui, 2012).

Enfin, il existe aussi un modèle qui se fonde exclusivement sur le renouvellement des cellules mémoires, et plus particulièrement des LT_{CM} . Dans ce dernier, à l'inverse du modèle de différenciation linéaire, ce sont des LT_{CM} qui, dans les organes lymphoïdes, vont pouvoir générer des LT_{EM} , qui eux se retrouveront par la suite dans la circulation et dans les tissus non lymphoïdes (Ahmed *et al.*, 2009).

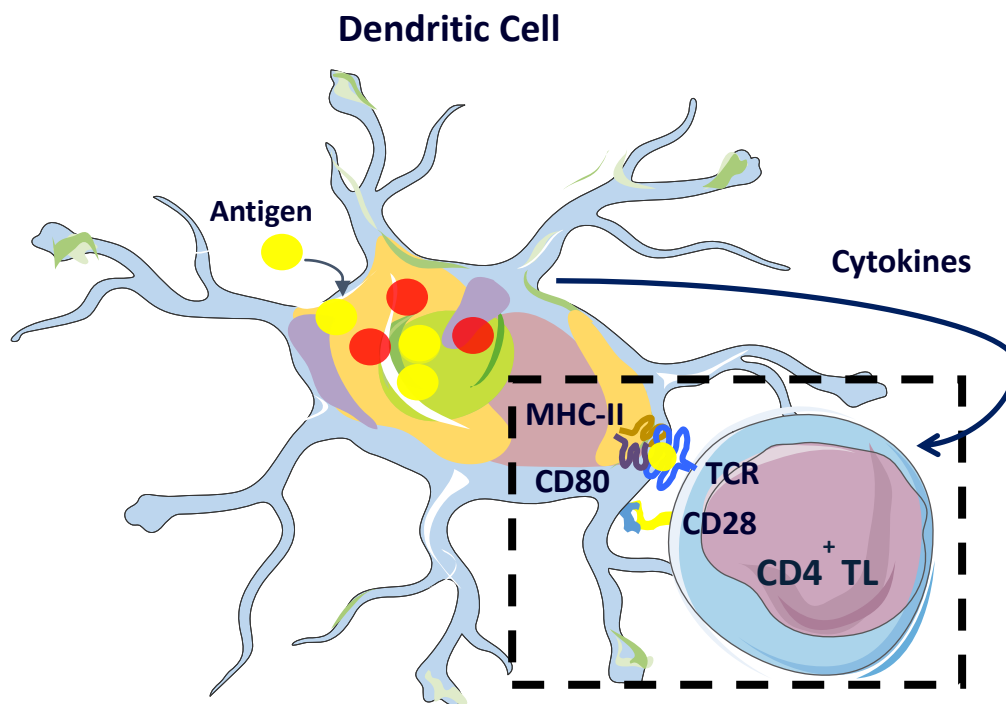


Figure 5 : Activation des LT CD4⁺

La CPA professionnelle (ici, une DC) fournit les trois signaux nécessaires pour activer un LT CD4⁺ naïf. Le premier signal est induit par l'interaction du TCR, exprimé à la surface du LT CD4⁺, avec la molécule du CMH-II présentant le peptide, exprimée à la surface de la CPA. Le second signal est médié par des molécules de co-stimulation, comme la molécule CD80 située sur la CPA qui interagit avec la molécule CD28, située sur le LT. Le troisième signal est apporté par des facteurs solubles, notamment des cytokines, qui sont en partie sécrétées par les CPA.

Chapitre II- Activation des LT CD4⁺

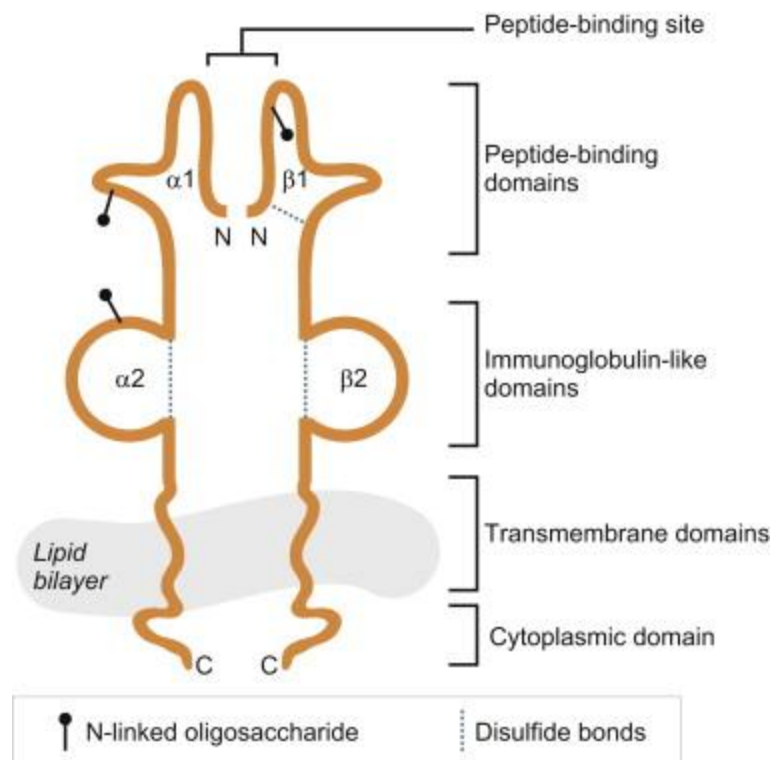
- **Origine des antigènes présentés aux LT**

Les LT CD8⁺ reconnaissent des peptides résultant de la dégradation d'antigènes endogènes présentés par les molécules du CMH-I exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Les LT CD4⁺ reconnaissent, quant à eux, principalement des peptides résultant de la dégradation d'antigènes exogènes présentés par les molécules du CMH-II exprimées uniquement à la surface des CPA, telles que les DC, les cellules B ou encore les monocytes macrophages, qui les activent (Neefjes *et al.*, 2011). Les DC, cellules au rôle central dans la réponse immunitaire adaptative car considérées comme les CPA les plus performantes, ont aussi la capacité de détourner les antigènes obtenus par endocytose et de les présenter par la voie du CMH-I pour activer les LT CD8⁺. Il s'agit du mécanisme de présentation croisée (Bevan, 1976). L'inverse peut également se produire, autrement dit les antigènes endogènes peuvent être également présentés sur des molécules du CMH-II (Eisenlohr *et al.*, 2011). Cette voie de présentation de l'antigène, appelée voie de présentation de l'antigène du CMH-II alternative ou non-classique, reste cependant moins bien caractérisée que les autres (*cf* section A.3 de ce chapitre).

- **Signaux nécessaires à l'activation des LT**

L'activation complète des LT nécessite 3 signaux présents au sein de la synapse immunologique (**Figure 5**). Le premier signal est fourni par l'interaction prolongée du complexe CMH/peptide avec le TCR. Cette interaction, entre les LT et les CPA, se déroule principalement dans les organes lymphoïdes secondaires. Le deuxième signal, dit de costimulation, est apporté principalement par l'engagement du récepteur CD28, exprimé à la surface des LT, avec les molécules costimulatrices B7.1 et B7.2, respectivement CD80 et CD86, présentes sur les CPA matures. Ce second signal est renforcé par des molécules d'adhérence, présentes à la surface des CPA, telles que CD54 (ICAM-1, *InterCellular Adhesion Molecule-1*) et CD58 (LFA-3, *Lymphocyte Function-associated Antigen-3*), qui, en interagissant avec leurs ligands présents à la surface des LT, respectivement, LFA-1 et CD2, vont permettre une meilleure transduction du signal. Enfin, le troisième signal est apporté par des facteurs solubles, dont les cytokines présentes dans l'environnement cellulaire.

L'environnement cytokinique contrôle la différenciation des LT CD4⁺ activés vers différents profils effecteurs et régulateurs exerçant des fonctions spécialisées, comme évoqué au chapitre I (section B.1 et 2).



Mak et al., *Primer to the Immune Response (chapter 6)*, 2014

Figure 6 : Structure des molécules HLA-II

Les molécules HLA-II sont constituées d'une chaîne α, comprenant les domaines extra-cellulaires α1 et α2, et d'une chaîne β, comprenant les domaines extra-cellulaires β1 et β2.

A- Signal 1 : présentation de l'antigène par les molécules HLA-II

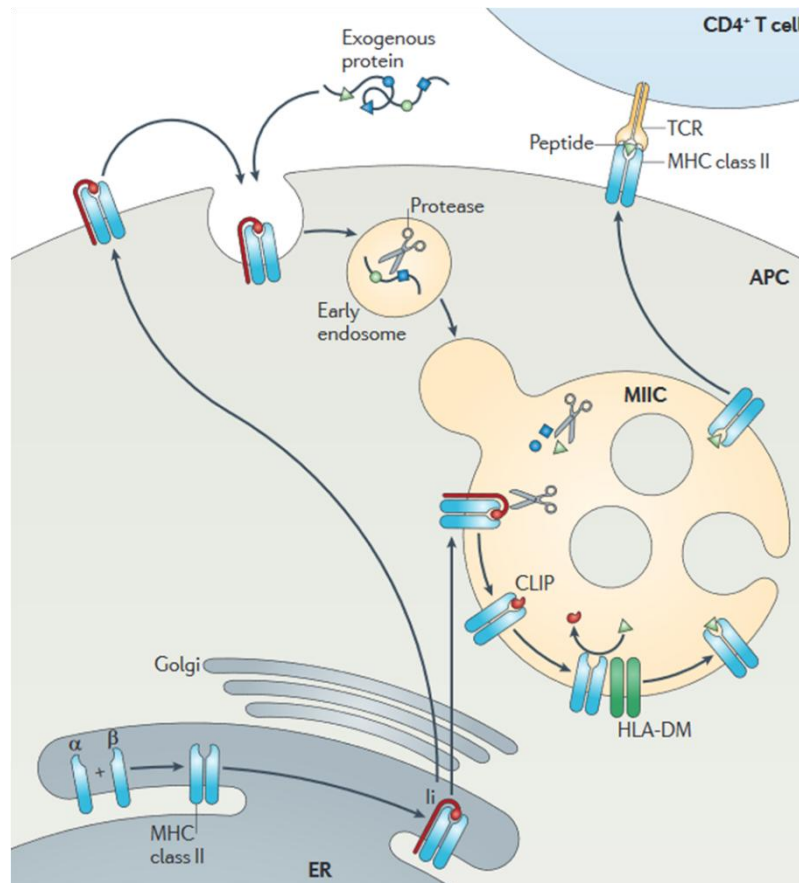
1) Les molécules HLA-II

Chez l'homme, les molécules du CMH-II sont appelées molécules HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-II. Il existe trois types de molécules HLA-II classiques : DP, DQ et DR. Il existe également deux molécules HLA-II non classiques appelées DM et DO. Ces molécules appartiennent à la superfamille des Ig et sont codées par des gènes localisés sur le bras court du chromosome 6.

Les molécules HLA-II sont formées de deux chaînes glycoprotéiques α (33 kDa) et β (28kDa) constituées d'une portion extracellulaire, d'une partie transmembranaire et d'une région cytoplasmique (**Figure 6**). Elles sont extrêmement polymorphiques et ont la particularité de lier un peptide antigénique entre les extrémités des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$.

Comme toutes les molécules HLA-II classiques, HLA-DM est exprimée par toutes les CPA professionnelles alors que HLA-DO est majoritairement exprimée par les LB (Alfonso & Karlsson, 2000). Les molécules HLA-DM et HLA-DO ne sont pas polymorphes et ne sont pas exprimées à la membrane plasmique mais au niveau endosomal.

L'expression des molécules HLA-II est en majeure partie régulée par un facteur transactivateur de classe II (CIITA, *Class II major histocompatibility complex TransActivator*) qui se lie à la région promotrice des gènes HLA-II. L'IFN- γ induit l'expression de *CIITA* et augmente indirectement l'expression des molécules du CMH-II sur les CPA (Kämper *et al.*, 2012). Des CPA non professionnelles sont capables d'exprimer des molécules du CMH-II dans des contextes inflammatoires (Reith *et al.*, 2005; Duraes *et al.*, 2015).



Neefjes et al., *Nature Reviews Immunology*, 2011

Figure 7 : Présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH-II

Les chaînes α et β des molécules du CMH-II forment un hétérotrimère dans le RE avec la chaîne Ii. Cet hétérotrimère ($\alpha/\beta/Ii$) migre, après maturation dans l'appareil de Golgi, dans le compartiment du CMH de classe II appelé le MIIC (*Major histocompatibility complex class-II Compartment*). Dans le MIIC, sous l'action de protéases, les protéines endocytées mais aussi des protéines endogènes vont être progressivement dégradées pour générer des peptides. Il en sera de même pour Ii, et seule la partie qui se lie au sillon de la molécule du CMH-II, appelée le peptide CLIP (*CLass II-associated Invariant chain Peptide*), subsistera. La protéine chaperonne HLA-DM permet le remplacement du peptide CLIP par un peptide exogène de meilleure affinité. Les complexes CMH-II/peptide migrent ensuite vers la membrane plasmique de la CPA pour interagir avec les TCR des cellules T CD4⁺.

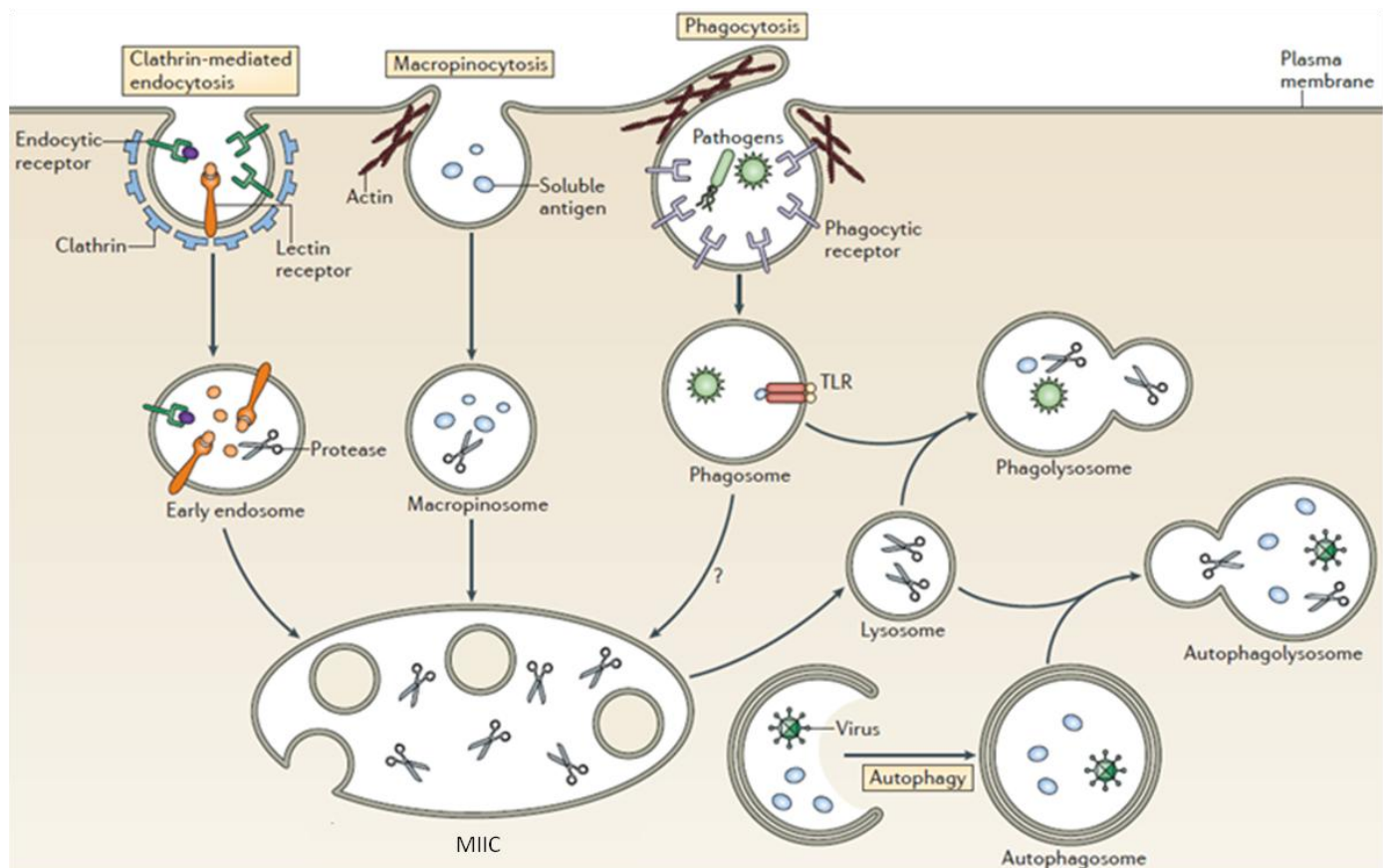
2) Voie exogène de présentation de l'antigène

Dans le RE (Réticulum Endoplasmique), les chaînes α et β de la molécule du CMH-II s'assemblent de façon non covalente, puis Ii (la chaîne invariante) vient se fixer sur cet hétérodimère. Cette association de la molécule Ii avec la molécule du CMH-II a plusieurs rôles : (i) elle régule la conformation de la molécule du CMH-II dans le RE, (ii) elle empêche les peptides du RE de se fixer dans la poche à peptide, et (iii) elle facilite le transport de la molécule du CMH-II vers le MIIC. En effet, la présence d'un motif di-leucine sur la queue cytoplasmique de Ii est nécessaire pour un adressage fonctionnel de la molécule du CMH-II au MIIC. Ce motif est reconnu par des protéines adaptatrices (AP, *Adaptor Proteins*) du réseau trans-golgien, AP1 et AP2. Ainsi le complexe CMH-II/Ii peut être envoyé dans le MIIC *via* un passage préalable par l'appareil de Golgi. Ces complexes peuvent également rejoindre directement la membrane plasmique de la CPA où ils seront rapidement endocytés par les endosomes précoces *via* une voie AP2 dépendante des clathrines, afin de rejoindre le MIIC (Neefjes *et al.*, 2011; ten Broeke *et al.*, 2013), comme illustré par la **Figure 7**.

Le MIIC est un compartiment cellulaire présentant une architecture très complexe. Il est aussi appelé compartiment multivésiculaire de classe II, ou endolysosome, car il est issu de la fusion d'endosomes tardifs avec des vésicules lysosomales. Dans les CPA professionnelles, les endolysosomes sont enrichis en molécules du CMH-II, en antigènes mais aussi en d'autres molécules impliquées dans la dégradation des antigènes (cathepsines ; enzyme GILT (*Gamma-Interferon-inducible Lysosomal Thiol reductase*) catalysant la réduction des cystéines). Ils expriment également les molécules HLA-DM et HLA-DO (Stern *et al.*, 2006). Ces compartiments sont donc au cœur de la voie de présentation de l'antigène sur les molécules du CMH-II. Dans le MIIC, les cathepsines S, L et F vont progressivement dégrader la chaîne Ii. Seul un fragment de Ii, le peptide CLIP, restera fixé dans la poche à peptide de la molécule du CMH-II. Chez l'homme, la protéine chaperonne HLA-DM va permettre l'échange du peptide CLIP avec un peptide antigénique. HLA-DM ne peut pas lier de peptides mais peut s'associer avec une molécule HLA-II pour provoquer la dissociation d'un complexe CMH-II/peptide de faible affinité. HLA-DM facilite ainsi la mise en place d'un complexe de grande affinité. Il a été observé que HLA-DO inhibait l'action de HLA-DM, particulièrement en milieu légèrement acide (ten Broeke *et al.*, 2013).

Pour ce faire, HLA-DM va se lier à HLA-DO, structurellement semblable aux molécules HLA-II, au lieu de se lier aux complexes HLA-II/peptide. HLA-DO agit donc comme un « leurre » pour HLA-DM. Le rôle de ces deux molécules, crucial dans la voie de présentation de classe II, est encore à l'étude actuellement (God *et al.*, 2015).

Pour la sortie du complexe CMH-II/peptide de la partie interne du MIIC, une machinerie de transport appelée complexe de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) est mise en jeu (Neefjes *et al.*, 2011). Le rôle joué par le cytosquelette, impliquant notamment les filaments d'actine et les microtubules, est crucial pour une migration correcte depuis le MIIC et donc *a fortiori* pour un bon apprêtement du complexe CMH-II/peptide à la membrane plasmique de la CPA. Dès qu'une protéine est endocytée, elle va d'abord être dégradée par diverses protéases dans l'endosome précoce. Puis, sa dégradation continuera dans le MIIC par l'action d'autres protéases lysosomales afin d'être réduite en peptides de 15-25 acides aminés qui pourront être présentés par les molécules du CMH-II (Neefjes *et al.*, 2011; Sadegh-Nasseri, 2016). En conditions d'activation des CPA, il a été rapporté que les compartiments MIIC ont la capacité de fusionner ensemble *via* l'action du cytosquelette, sûrement dans le but d'accroître la quantité de complexes CMH-II/peptide pouvant être présentés (van Nispen tot Pannerden *et al.*, 2010). L'expression des molécules du CMH-II à la surface des CPA ainsi que leur demi-vie sont régulées par un phénomène d'ubiquitinylation, médiée par l'ubiquitine ligase MARCH1 (*Membrane-Associated Ring-CH1*). Les molécules du CMH-II sont ubiquitinylées *via* un motif lysine, conservé dans l'évolution et présent sur la queue cytoplasmique de leur chaîne β . Le recyclage de ces molécules est médié par un processus d'endocytose mettant à contribution les endosomes précoces afin de les renvoyer au MIIC (Oh & Shin, 2015; Wilson *et al.*, 2018).



Roche & Furuta, *Nature Reviews Immunology*, 2015

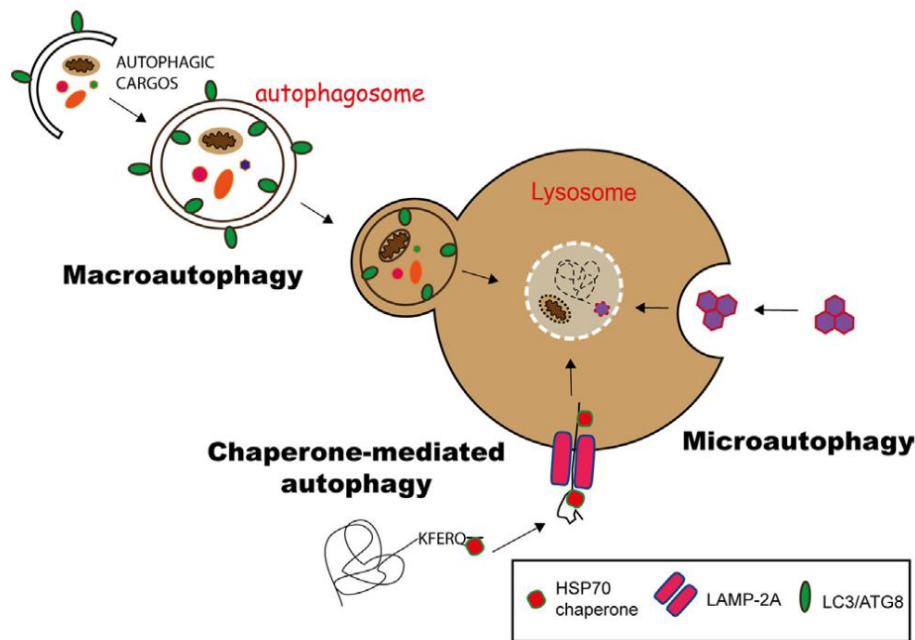
Figure 8 : Mécanismes impliqués dans le transport des antigènes exogènes dans le compartiment MIIC

De façon conventionnelle, les CPA possèdent plusieurs mécanismes pour internaliser des antigènes exogènes. Il y a le mécanisme d'endocytose médié par les clathrines, la macropinocytose et la phagocytose. Ces mécanismes vont engendrer la formation de vésicules intracellulaires (endosomes précoces, macropinosomes, phagolysosomes) dans lesquelles les antigènes vont commencer à être dégradés par des protéases. Ces vésicules vont ensuite fusionner avec le compartiment MIIC. Dans le MIIC, ces antigènes continueront à être dégradés par d'autres protéases afin de générer des peptides qui pourront être présentés par les molécules du CMH-II. En parallèle, des antigènes endogènes peuvent être la cible des autophagosomes et, après dégradation dans les autophagolysosomes, ils pourront également rejoindre le MIIC pour charger des molécules du CMH-II.

Ici, il est important de préciser que les CPA professionnelles disposent de plusieurs mécanismes pour capter les antigènes exogènes (**Figure 8**). Il y a l'endocytose médiée par les récepteurs qui se fait *via* des vésicules revêtues de clathrine. Elle nécessite la liaison de l'antigène à l'un des récepteurs présents sur les CPA (par exemple, les récepteurs de lectine), ce qui entraîne leur internalisation dans les compartiments intracellulaires appelés endosomes précoces. Il existe également le mécanisme de macropinocytose. Ce dernier est un processus dépendant de l'actine qui conduit à l'absorption par la cellule d'antigènes solubles dans un compartiment appelé macropinosome. Enfin, les CPA disposent également de la phagocytose, un processus d'endocytose dans lequel des particules opsonisées se lient à divers récepteurs. Suite à ces interactions entre antigènes opsonisés et récepteurs spécifiques, la cellule réorganise sa membrane plasmique afin de former un compartiment intracellulaire contenant ces antigènes, le phagosome, *via* un mécanisme dépendant de l'actine. Ces différents compartiments (endosomes précoces, macropinosomes et phagosomes) vont ensuite pouvoir apporter les antigènes au MIIC (Roche & Furuta, 2015).

3) Voie endogène de présentation de l'antigène

Des études ont mis en évidence le fait que les antigènes endogènes peuvent être présentés sur des molécules du CMH-II au lieu d'être présentés sur les molécules du CMH-I. Actuellement, ces mécanismes alternatifs de présentation de l'antigène sur les molécules du CMH-II restent mal compris et peu étudiés. Pourtant, ils ont été mis en évidence, pour la première fois, il y a près de 30 ans dans des études démontrant que des antigènes dérivant d'Ig synthétisées au sein des LB par dégradation endogène, pouvaient être présentés sur les molécules du CMH-II (Bikoff & Birshstein, 1986; Weiss & Bogen, 1989, 1991; Bikoff & Eckhardt, 1989). Par la suite, des études basées sur l'élution de peptides présents dans les poches des molécules du CMH-II, caractérisés par spectrométrie de masse, ont révélé qu'une grande partie de ces peptides provenaient de protéines cytosoliques (Rudensky AY *et al.*, 1991; Chicz *et al.*, 1993; Rammensee *et al.*, 1999). L'étude de la présentation des antigènes viraux sur les molécules du CMH-II a également beaucoup contribué à la compréhension de ces mécanismes (Eisenlohr *et al.*, 2011; Veerappan Ganesan & Eisenlohr, 2017).



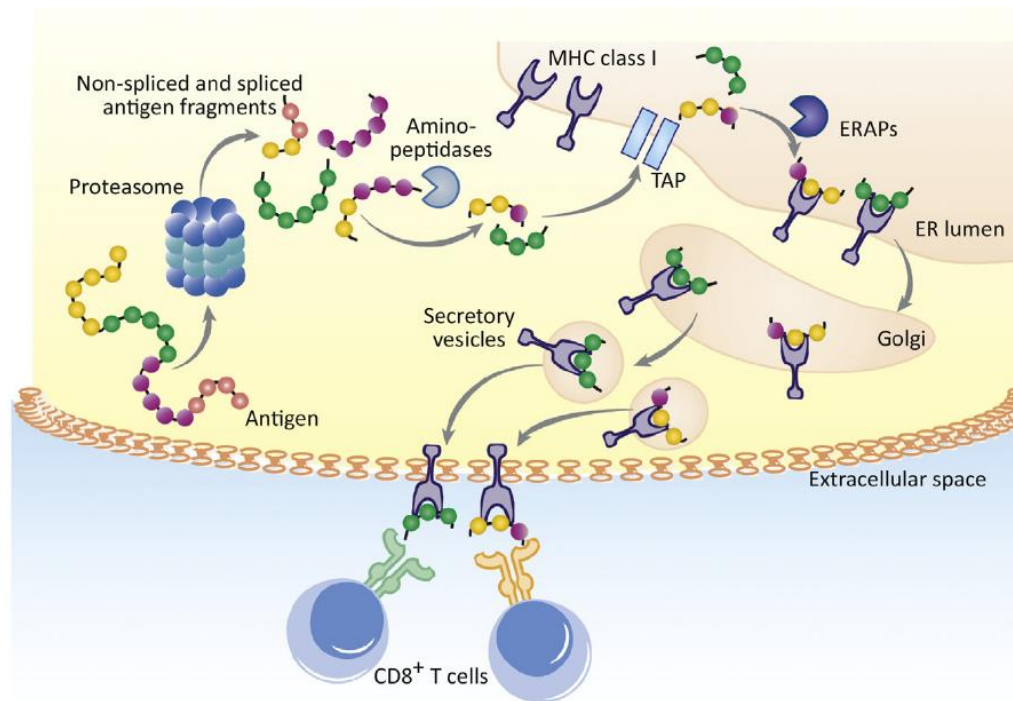
Duraes et al., *Frontiers in Immunology*, 2015

Figure 9 : Mécanismes d'autophagie impliqués dans le transport des antigènes endogènes dans le compartiment MHC

Au sein de la CPA, plusieurs mécanismes d'autophagie permettent à des antigènes endogènes de rejoindre la voie de présentation de l'antigène sur les molécules du CMH-II. Premièrement, il y a la macroautophagie. Celle-ci se produit *via* la formation d'autophagosomes dans le cytoplasme, qui vont capturer des endogènes intracellulaires lors de leur formation, puis les fusionner avec les lysosomes. Deuxièmement, il y a la microautophagie, qui correspond à une invagination des membranes lysosomales et qui permet de transférer des antigènes cytosoliques dans les lysosomes. Enfin, il y a le mécanisme d'autophagie médié par des protéines chaperonnes. Ce dernier repose sur la reconnaissance des antigènes cytosoliques contenant le motif pentapeptidique KFERQ par des protéines chaperonnes (telles que la molécule HSP70, *Heat Shock Protein 70*), et sur leur transfert dans les lysosomes grâce à l'action des protéines LAMP-2a. En fusionnant avec d'autres vésicules intracellulaires (endosomes, phagosomes,...) qui rejoindront le compartiment MHC, les lysosomes qui contiennent ces antigènes endogènes vont permettre leur présentation sur les molécules du CMH-II.

a) Les voies autophagiques

Concernant ces mécanismes, de nombreuses études démontrent que des antigènes intracellulaires peuvent être présentés sur les molécules du CMH-II *via* des mécanismes d'autophagie, (**Figure 9**) comme l'ont rapporté Roche et Furuta (Roche & Furuta, 2015) processus cataboliques dans lesquels des éléments cytoplasmiques sont adressés aux endolysosomes. Il y a le phénomène de macroautophagie qui correspond à la capture des substances cytosoliques par des vésicules à double membrane appelées autophagosomes. Ces vésicules vont ensuite fusionner avec les lysosomes (formation des autophagolysosomes) pour délivrer leur matériel en vue d'une dégradation ultérieure par les enzymes lysosomales. Plusieurs antigènes viraux, tels que ceux provenant de l'EBV (*Epstein-Barr Virus*), mais aussi du VIH, sont présentés sur les molécules du CMH-II suite à ce phénomène (Paludan *et al.*, 2005; Coulon *et al.*, 2016). Il existe également un phénomène d'autophagie médié par les protéines chaperonnes. Ce phénomène repose sur le transfert des antigènes cytosoliques contenant le motif pentapeptidique KFERQ vers les lysosomes *via* l'action de la protéine LAMP-2a (*Lysosome Associated Membrane Protein-2a*). Il est notamment très important pour la présentation des auto-antigènes cytosoliques (Zhou *et al.*, 2005; Dice, 2007). Il existe également des mécanismes de microautophagie. Ces derniers reposent sur la formation de corps microvésiculaires par invagination des membranes lysosomales qui vont pouvoir envelopper les antigènes cytosoliques (Sahu *et al.*, 2011).



Mishto & Liepe, *Trends in Immunology*, 2017

Figure 10 : Présentation de l'antigène et mécanisme d'épissage peptidique

Classiquement, les peptides dérivés d'antigènes protéiques endogènes sont présentés sur les molécules du CMH-I. Ces antigènes sont tout d'abord dégradés par le protéasome. Des modifications post-traductionnelles résultant d'un épissage peptidique peuvent avoir lieu lors de la dégradation des antigènes protéiques par le protéasome. Les épitopes ainsi produits sont appelés *spliced-peptides*. Les fragments protéiques générés par le protéasome sont séquentiellement dégradés par des amino-peptidases cytosoliques avant d'être transportés dans le RE, via la machinerie TAP, où leur dégradation se poursuivra, par l'action des amino-peptidases présentes dans cet organite (ERAPs, *Endoplasmic Reticulum AminoPeptidases*). Les peptides générés vont ensuite pouvoir charger les poches à peptide des molécules du CMH-I. Les complexes CMH-I/peptide formés dans le RE vont subir une étape de maturation au niveau de l'appareil de Golgi, avant d'être transportés à la membrane plasmique de la CPA pour interagir avec le TCR des LT CD8⁺. Des peptides issus de ce type d'épissage peuvent aussi être chargés sur les molécules du CMH-II.

b) Les voies non-autophagiques

- **Détournement de la machinerie impliquée dans la voie de présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I**

Des équipes ont cherché à savoir si des éléments de la voie de présentation des antigènes endogènes par les molécules du CMH-I étaient impliqués dans la voie de présentation alternative par les molécules du CMH-II. Le composant principal de la dégradation des protéines cytosoliques est le protéasome multicatalytique, connu pour générer des peptides qui seront ensuite acheminés dans le RE *via* le transporteur TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) afin de se fixer sur les molécules du CMH-I. Ces complexes CMH-I/peptide subiront ensuite une étape de maturation dans l'appareil de Golgi, avant de migrer à la membrane plasmique de la CPA pour interagir avec le TCR d'un LT CD8⁺ (**Figure 10**). Le groupe de Laurence Eisenlhor a démontré avec plusieurs épitopes CD4 issus de l'antigène HA (HémAgglutinine) du virus de la grippe que leur présentation *in vitro* est en partie abrogée en présence d'un inhibiteur du protéasome (Tewari *et al.*, 2005). La machinerie TAP est donc également mise en jeu dans la présentation par les molécules du CMH-II de ces antigènes endogènes. Le protéasome et la machinerie TAP semblent même être impliqués dans une part importante de ces réponses T CD4⁺ générées contre les antigènes endogènes du virus de la grippe, à hauteur de 40 à 50% (Tewari *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2015).

Pour expliquer la fixation de peptides sur les molécules du CMH-II dans le RE, des études ont montré que des conditions de stress, telles qu'une infection virale, peuvent modifier le rapport entre les molécules du CMH-II et les molécules Ii, entraînant la liaison de protéines mal conformées aux molécules du CMH-II (Aichinger & Lechler, 1995; Lechler *et al.*, 1996). Ces études ont également mis en avant que des niveaux élevés d'antigènes pourraient permettre un chargement d'antigène sur les molécules du CMH-II dans le RE. Ceci a été démontré ultérieurement par Jiang et collaborateurs (Jiang *et al.*, 2013). Il existe de nombreux épitopes CD4, présentés en l'absence d'expression de Ii (Fortin *et al.*, 2013). Des cellules cancéreuses déficientes pour Ii ont été utilisées pour stimuler des LT CD4⁺ anti-tumoraux (Chornoguz *et al.*, 2012).

En plus du rôle du protéasome dans la génération d'antigènes endogènes présentés sur les molécules du CMH-II, un autre mécanisme a été proposé et ferait intervenir un intermédiaire post-protéasomal qui serait transféré dans les endosomes précoces, pour un traitement additionnel par l'enzyme GILT (Thiele *et al.*, 2015; Veerappan Ganesan & Eisenlohr, 2017).

- **Recyclage des molécules du CMH-II**

Outre le chargement des épitopes décrit ci-dessus, les peptides pourraient également être chargés sur des molécules membranaires du CMH-II internalisées par le biais de la voie de recyclage. En étudiant des épitopes dérivés de protéines du virus de la grippe (*influenza* virus, souche A/PR/8/34, HA) restreints à la molécule du CMH-II murin I-E^d, Tewari et collaborateurs ont montré que des épitopes CD4 peuvent nécessiter une dégradation par le protéasome et une prise en charge par la machinerie TAP pour être délivrés aux endosomes précoces, où ils seront chargés sur les molécules du CMH-II recyclées (Tewari *et al.*, 2005). D'autres études ont rapporté que les molécules du CMH-II étaient capables d'internaliser et d'échanger des peptides antigéniques dans les endosomes et que les complexes CMH-II/peptide ainsi créés pouvaient également être exprimés à la membrane plasmique *via* une voie indépendante des clathrines (Reid & Watts, 1990; Pathak *et al.*, 2001; Walseng *et al.*, 2008).

c) Exemple de l'antigène NY-ESO-1

L'antigène NY-ESO-1 (*New York-ESophageous-1*) est une protéine cytosolique et nucléaire appartenant à la famille des antigènes CT (*cf* chapitre III.A.2). Cet antigène, qui n'est pas exprimé par les cellules somatiques saines, peut être exprimé par plusieurs types de cellules tumorales. Il a été démontré que les cellules cancéreuses, *via* de multiples voies de présentation de l'antigène par les molécules du CMH-II, présentaient sélectivement des épitopes de l'antigène NY-ESO-1, reconnus par des LT CD4⁺. Certains de ces épitopes détournent la machinerie du CMH-I, en utilisant le protéasome et la machinerie TAP (Matsuzaki *et al.*, 2014).

Ensuite, le rôle de la protéine chaperonne HSP90 a été démontré dans la présentation d'épitopes NY-ESO-1, en permettant la translocation de peptides cytosoliques dégradés par le protéasome vers les compartiments endosomaux (Matsuzaki *et al.*, 2014; Leung, 2015). Une étude a également montré que l'adressage de NY-ESO-1 à l'autophagosome, par transfert de gène, *via* le couplage à un marqueur spécifique (Atg8/LC3, *Autophagy-related protein 8/microtubule-associated protein Light Chain 3*), permettait d'augmenter la reconnaissance des cellules tumorales par des LT CD4⁺ (Fonteneau *et al.*, 2016).

d) Conclusion

L'ensemble de ces mécanismes alternatifs de présentation de l'antigène n'est pas encore entièrement élucidé. A titre d'exemple, le rôle de la molécule HLA-DM dans la présentation de ces épitopes endogènes est variable selon les études (Dani *et al.*, 2004; Tewari *et al.*, 2005). Cependant, ces mécanismes augmentent à coup sûr le panel de peptides pouvant être présentés par les molécules HLA-II. Il a été proposé que la localisation et la conformation des antigènes gouvernaient la voie de présentation qui sera utilisée pour leur apprêtement, et leur présentation possible par les molécules du CMH-II (Mimura *et al.*, 2007; Leung *et al.*, 2010). On estime aujourd'hui qu'au minimum 20 à 30% des peptides qui sont présentés sur les molécules du CMH-II sont issus de ces voies alternatives (Adamopoulou *et al.*, 2013). Récemment, il a également été montré que l'immunisation de souris avec de faibles doses d'*influenza virus* vivant, favorisant les voies de présentation endogènes, comparées à des doses beaucoup plus élevées du virus inactivé, favorisant les voies de présentation exogènes, étaient à l'origine de titres d'anticorps protecteurs, CD4⁺ dépendants, plus importants (Miller *et al.*, 2015). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une meilleure compréhension des voies alternatives de présentation de l'antigène par les molécules du CMH-II permettrait une optimisation significative des stratégies vaccinales et des immunothérapies.

4) Le transfert de membrane (*cross-dressing*)

Une autre façon pour les cellules de pouvoir présenter l'antigène est le transfert de complexes CMH/peptide par les cellules voisines. Ce phénomène, appelé *cross-dressing*, implique donc un transfert intercellulaire de complexes CMH/peptide fonctionnels préformés, depuis des cellules donneuses vers des cellules receveuses, via trois processus possibles : la trogocytose, la formation d'exosomes, et la mise en place de nanotubes « à effet tunnel » (Campana *et al.*, 2015).

a) *Cross-dressing* direct

- **La trogocytose**

La trogocytose correspond à un transfert dynamique de portions membranaires se produisant très rapidement après l'interaction entre deux cellules vivantes. La trogocytose ne correspond pas à un transfert sélectif de protéines. Ainsi, pendant ce processus, certaines protéines voisines seront transférées passivement avec les portions membranaires. Plusieurs études ont déjà suggéré que des interactions entre cellules immunitaires peuvent entraîner un transfert efficace de molécules membranaires (Patel *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2000). Comme pour d'autres cellules immunitaires, les DC, principalement les DC immatures, peuvent acquérir des portions membranaires mais aussi des antigènes provenant d'autres cellules vivantes par un mécanisme dépendant du contact cellulaire (Russo *et al.*, 2000; Harshyne *et al.*, 2001). La trogocytose résultant du transfert de molécules du CMH (I et II) peut se produire entre CPA, entre CPA et LT ou entre CPA et cellules NK, mais aussi entre cellules tumorales et cellules du SI (Davis, 2007; Roda-Navarro & Reyburn, 2007; Smyth *et al.*, 2007; Rechavi *et al.*, 2009; Dhainaut & Moser, 2014; Nakayama, 2015). Récemment, il a été montré que les basophiles pouvaient acquérir des molécules du CMH issues de DC *via* le processus de trogocytose. L'acquisition de ces molécules ainsi que de la molécule de costimulation CD86 confère une réelle capacité de CPA aux basophiles, lesquels deviennent capables de stimuler des LT CD4⁺ spécifiques fonctionnels de phénotype Th2 (Miyake *et al.*, 2017).

- **Les nanotubes « à effet tunnel »**

Ces nanotubes correspondent à de longues protubérances membranaires qui assurent la communication entre cellules. Ces ponts cellulaires membranaires entre les cellules interviennent dans le transfert intercellulaire des organites, des composants de la membrane plasmique et des molécules cytoplasmiques (Gerdes & Carvalho, 2008). Il a été montré que les nanotubes pouvaient médier le transfert de molécules du CMH entre des cellules distantes, suggérant qu'ils pourraient permettre le *cross-dressing*, en particulier entre les DC éloignées les unes des autres (Schiller *et al.*, 2013). Les molécules du CMH-I et du CMH-II peuvent être transférées, même s'il a été observé, lorsque des DC murines étaient co-cultivées avec des DC allogéniques ou avec des cellules endothéliales, que le transfert des molécules du CMH-II était le plus efficace (Herrera *et al.*, 2004; Smyth *et al.*, 2007). Il a également été montré qu'une membrane cellulaire intacte n'était pas nécessairement requise pour que ce phénomène se produise. En effet, les DC ont la capacité d'acquérir des molécules du CMH (I et II) à partir de cellules donneuses, même en cas de rupture de la membrane plasmique causée par un choc thermique ou une lyse osmotique (Dolan *et al.*, 2006a,b).

b) *Cross-dressing* indirect

Ce type de *cross-dressing* met en jeu des exosomes. Les exosomes sont de petites vésicules membranaires (de 30 à 100 nm de diamètre) qui se forment dans les compartiments endosomaux multivésiculaires tardifs. Ils sont ensuite libérés dans l'environnement extracellulaire par invagination de la membrane des vésicules avec la membrane cellulaire (Leone *et al.*, 2018). La sécrétion d'exosomes a été rapportée pour de nombreux types de cellules immunitaires, incluant notamment les mastocytes, les DC, les LB, les LT et les cellules tumorales. Elle a également été décrite pour les réticulocytes, les plaquettes, les cellules épithéliales intestinales et les neurones (Février & Raposo, 2004; Fauré *et al.*, 2006). Les exosomes constituent une source d'antigènes supplémentaires qui pourront être pris en charge par les CPA afin d'être présentés sur les molécules du CMH, mais ils sont également une source de complexes CMH/peptide fonctionnels (Wolfers *et al.*, 2001; Andre *et al.*, 2002; Théry *et al.*, 2002, 2009).

Le potentiel immunostimulateur de ces complexes présents à la surface des exosomes, libérés par les DC, est très important car ils peuvent, sur les exosomes, induire une activation de LT spécifiques *in vivo* (Zitvogel *et al.*, 1998; Bedford *et al.*, 1999; Harshyne *et al.*, 2001). Bien qu'ils représentent un moyen efficace pour transférer des antigènes peptidiques aux DC, les exosomes ne semblent pas capables de directement transférer leur complexes CMH/peptide à la membrane de ces CPA (Wakim & Bevan, 2011). Dans le cadre des cancers, il a été rapporté que des antigènes tumoraux transférés par des exosomes dérivés de tumeurs étaient efficacement pris en charge et présentés sur les molécules du CMH des DC, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives aux immunothérapies anti-tumorales (Andre *et al.*, 2002; Pitt *et al.*, 2016a; Wolfers *et al.*, 2001).

c) Conclusion

Il a également été rapporté que des cellules telles que les cellules stromales des ganglions lymphatiques (LNSC, *Lymph Node Stromal Cells*) ainsi que les cellules lymphoïdes innées (ILC, *Innate Lymphoid Cells*) de type 2 pouvaient acquérir des molécules du CMH-II issues de DC (Nakayama *et al.*, 2011; Spits *et al.*, 2013; Dubrot *et al.*, 2014). D'autres études ont également montré que les LT pouvaient acquérir des molécules du CMH-II et des molécules de costimulation, issues de DC mais aussi de fibroblastes modifiés génétiquement par transfert de gènes, pour agir comme de véritables CPA en soutenant la prolifération des LT CD4⁺ (Tatari-Calderone *et al.*, 2002; Game *et al.*, 2005). Il a aussi été montré que des LT CD4⁺ anti-tumoraux pouvaient s'activer grâce à des DC ayant préalablement acquis des complexes CMH-II/peptide issus de cellules tumorales *via* le processus de *cross-dressing* (Dolan *et al.*, 2006a). Ces mécanismes sont donc potentiellement importants dans les réponses anti-tumorales. Ils ajoutent un degré de complexité aux mécanismes de présentation de l'antigène sur les molécules du CMH (notamment de classe II) mais ils représentent également un moyen supplémentaire pour le SI de protéger l'organisme face aux agressions qu'il peut subir.

5) Epissage des peptides

Il a récemment été découvert que les LT CD8⁺ et CD4⁺ pouvaient reconnaître des épitopes résultant de modifications post-traductionnelles issues d'un épissage peptidique, aussi appelés *spliced-peptides*. Ce processus bien documenté en ce qui concerne les antigènes peptidiques T CD8⁺, reste peu documenté pour les épitopes T CD4⁺ (Platteel *et al.*, 2017a).

a) Epissage des peptides T CD8⁺

Une des étapes majeures de la transformation d'un antigène protéique en épitopes T CD8⁺ se fait dans le protéasome, avec différentes protéases dégradant les protéines en peptides. Il est désormais connu que le protéasome peut aussi couper et recoller des séquences peptidiques, libérant ainsi des antigènes peptidiques qui ne correspondent pas à la séquence de la protéine d'origine : c'est l'épissage peptidique protéasomal. Cet épissage de peptides par le protéasome peut aboutir à la génération de peptides issus d'acides aminés éloignés dérivant d'une même protéine initiale ou de deux protéines différentes. Les peptides ainsi produits peuvent être présentés sur des molécules HLA-I et reconnus par des LT CD8⁺ cytotoxiques (Hanada *et al.*, 2004). De tels épitopes ont notamment été rapportés dans le cadre des cancers (Michaux *et al.*, 2014) mais aussi dans le cadre d'infections bactériennes (Platteel *et al.*, 2016, 2017b).

Actuellement, les mécanismes impliqués dans ce phénomène d'épissage peptidique ne sont pas entièrement élucidés (Berkers *et al.*, 2015; Mishto & Liepe, 2017; Vigneron *et al.*, 2018; Liepe *et al.*, 2018). Néanmoins, il a été suggéré que ces mécanismes impliquent notamment une réaction de transpeptidation *via* une acyl-enzyme (intermédiaire dans l'hydrolyse de substrats par certaines peptidases et estérases) que se lie à l'un des fragments peptidiques de la protéine parentale et à une sous-unité catalytique du protéasome. La transpeptidation est une réaction chimique au cours de laquelle un résidu, acide aminé ou peptide, est transféré d'un composé aminé à un autre. *In fine*, cette réaction de transpeptidation aboutit à la création d'une nouvelle liaison peptidique qui assemble deux fragments, conduisant à la formation d'un peptide épissé portant un prolongement en C-terminal. L'extension C-terminale est ensuite dégradée par le protéasome pour libérer le peptide antigénique (Michaux *et al.*, 2014; Vigneron & Van den Eynde, 2014).

Récemment, des expériences d'immunoprécipitation de complexes HLA suivie d'une analyse par spectrométrie de masse des peptides élués à partir de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (GR-LCL et C1R) et de fibroblastes humains. Cette étude a montré que 30% des peptides HLA-I restreints obtenus à partir de ces lignées avaient subi un épissage peptidique par le protéasome (Liepe *et al.*, 2016).

b) Epissage des peptides T CD4⁺

Via la capacité de certains peptides endogènes à être présentés sur des molécules HLA-II, impliquant notamment des voies dépendantes du protéasome, il est théoriquement envisageable que certains peptides épissés puissent être également présentés sur ces molécules. Il a été très récemment décrit que des épitopes formés par transpeptidation pouvaient être présentés sur les molécules HLA-II, notamment dans le cadre du diabète auto-immun de type 1 (T1D, *Type 1 Diabetes*). Dans cette pathologie, des LT sont responsables de la destruction des cellules β des îlots pancréatiques, productrices d'insuline. Deux études (DeLong *et al.*, 2016; Wiles *et al.*, 2017) ont permis de mettre en évidence des épitopes hybrides dérivés de l'insuline, spécifiquement reconnus par des LT CD4⁺ de souris NOD (*Non-Obese Diabetic*, un modèle murin pour le T1D). Ces peptides hybrides étaient présents dans les cellules β du pancréas des souris NOD, et leurs îlots pancréatiques étaient infiltrés de LT spécifiques. Ces études ont également montré que des LT CD4⁺ issus d'îlots pancréatiques de patients T1D étaient capables de reconnaître ces peptides hybrides. De façon très intéressante, cette reconnaissance se faisait dans un contexte HLA-DQ8, molécule associée à un risque accru de développer un T1D. Cependant, les mécanismes exacts impliqués dans la production de ces peptides hybrides restreints aux molécules HLA-II restent encore à être décryptés (Wiles *et al.*, 2017). Une des hypothèses est que, dans ce cas précis, les peptides hybrides dérivés de l'insuline pourraient résulter de l'activité protéolytique importante qui se déroule dans les cellules β fonctionnelles (notamment au niveau de leurs granules), ceci indépendamment du protéasome (Mannering *et al.*, 2018). Les réponses T CD4⁺ observées contre ces peptides hybrides pourraient en partie expliquer la rupture de tolérance immunitaire qui se produit dans le cadre du T1D.

Tableau 1 : Rôles des molécules de costimulation dans la différenciation des LT CD4⁺D'après Magee *et al.*, *American Journal of Transplantation*, 2012

Lineage	Physiological Function	Co-stimulatory molecules that promote lineage differentiation	Co-stimulatory molecules that inhibit lineage differentiation
Th1	Cellular immunity against intracellular pathogens; Viral immunity	CD40L TIM-1 CD28 OX40 ICOS	TIM-3 CTLA-4 PD-L1
Th2	Humoral immunity; B cell help - Regulation of B cell activation and antibody class switching; Control of extracellular parasitic/helminthic infections	CD28 OX40 ICOS TIM-1 TIM-4	CTLA-4 PD-L1 TIM-2
Th17	Mediation of responses to extracellular bacteria and fungi	CD28 ICOS TIM-1 CD40L OX40	TIM-3 TIM-4 CTLA-4
Tfh	B cell help; Regulation of effector and memory B cell responses; Role in germinal center formation and switched antigen-specific antibody responses	CD28 ICOS CD40L OX40	PD-1 PD-L1
Treg	Regulation/suppression of the immune response; Maintenance of self-tolerance	CD28 (nTreg) CTLA-4 PD-1/PD-L1 TIM-3 GITR	CD28 (iTreg) OX40 TIM-1

B- Signal 2 : molécules de costimulation

Comme mentionné précédemment, l'activation complète et efficace des LT s'effectue au sein de la synapse immunologique, par le biais de CPA qui vont apporter les trois signaux essentiels (*cf* Figure 5). Le signal 2 est apporté par l'interaction de molécules de costimulation. Elles font partie de la SF-Ig (SuperFamille des Immunoglobulines, également connue sous le nom de famille CD28/B7), de la TNFRSF (*Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily*) ou de la famille des molécules de costimulation TIM (*T-cell Immunoglobulin domain and Mucin domain*), décrite plus récemment (Rodriguez-Manzanet *et al.*, 2009). Parmi ces molécules, certaines sont activatrices et d'autres sont immuno-régulatrices (voire inhibitrices). Elles vont agir à des moments bien précis de la réponse immunitaire pour réguler très finement l'activation et la différenciation des LT (**Tableau 1**). La modulation de ce signal 2 ouvre des perspectives thérapeutiques très attractives pour traiter les cancers *via* le développement d'anticorps agonistes ou antagonistes, qui vont favoriser l'activation des LT anti-tumoraux (Mayes *et al.*, 2018). Par souci de concision, seuls les principaux membres de ces familles de molécules de costimulation seront décrits ci-dessous.

1) La superfamille des immunoglobulines (SF-Ig)

a) CD28/B7.1 et B7.2

Les molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) sont les ligands de CD28. Elles sont toutes deux exprimées par les CPA professionnelles (DC, LB et macrophages) alors que la molécule CD28 est exprimée de façon constitutive à la surface de la majorité des LT. Les molécules B7.1 et B7.2 partagent les mêmes ligands. Néanmoins, la force de l'interaction requise pour lier B7.2 est plus faible que celle requise pour lier B7.1. De plus, il a été mis en évidence que B7.1 favoriserait la différenciation Th1 tandis que B7.2 favoriserait la différenciation Th2 (Kuchroo *et al.*, 1995; Bhatia *et al.*, 2006). Ces molécules constituent le signal de costimulation le plus fort délivré par les CPA aux LT, pour permettre de les activer pleinement, de proliférer et de sécréter de l'IL-2 (Driessens *et al.*, 2009). En effet, au niveau du LT, ces interactions vont entraîner l'activation des voies de signalisation PI3K-PKB/Akt-NF- κ B (*PhosphoInositide-3 Kinase-Protein Kinase B-Nuclear Factor- κ B*) et MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), qui, elles, vont promouvoir la prolifération, la production de cytokines mais aussi les réponses mémoires et la survie des LT (Song *et al.*, 2008a).

b) CTLA-4/B7.1 et B7.2

Les molécules B7.1 et B7.2 partagent également un autre ligand que CD28, la molécule CTLA-4 (CD152). Cette dernière présente notamment une meilleure affinité pour ses ligands que CD28. La molécule CTLA-4 exerce une activité immuno-régulatrice au cours des réponses immunitaires afin de les contrôler. L'expression de CTLA-4 peut être induite à la surface des LT, 24 à 48 heures après leur activation (Perkins *et al.*, 1996). De plus, son expression est directement dépendante du signal de costimulation CD28, étant donné que CTLA-4 limite ce signal de costimulation en venant « détourner » les ligands de CD28 afin d'entraîner des effets immuno-régulateurs qui vont empêcher une exacerbation de la réponse immunitaire.

Il a été démontré que la molécule CTLA-4 était capable de capturer les molécules B7.1 et B7.2, présentes à la surface des cellules voisines, par mécanismes de trans-endocytose. Ces molécules sont alors dégradées au sein des cellules CTLA-4⁺ (Qureshi *et al.*, 2011). D'autres mécanismes médiés par CTLA-4 conduisent à l'inhibition des LT effecteurs. Par exemple, au niveau des DC, l'interaction des molécules B7.1 et B7.2 avec CTLA-4 peut entraîner l'activation de l'enzyme IDO (*Indoleamine 2,3 dioxygenase*), qui va métaboliser le tryptophane en kynurénine, un métabolite immunosuppresseur (Grohmann *et al.*, 2002). Ces interactions peuvent également conduire, au niveau de ces cellules, à l'activation du facteur de transcription immuno-régulateur FoxO3 (*Forkhead box O3*), inhibant ainsi leur production de cytokines (Dejean *et al.*, 2009; Wing & Sakaguchi, 2010). Au niveau du LT, l'engagement des molécules B7.1 et B7.2 avec CTLA-4 va notamment entraîner l'inhibition de la protéine kinase ZAP-70 (*Zeta-chain-Associated Protein kinase 70*), indispensable à la signalisation intracellulaire médiée par le TCR, mais également de façon plus générale à l'inhibition des voies de signalisation PI3K-Akt-NF-κB. *In fine*, ces interactions auront donc pour conséquences d'inhiber l'activation et la prolifération des LT (Zhao *et al.*, 2018). Chez la souris, il a été mis en évidence que l'engagement de la molécule CTLA-4 inhibait la polarisation Th17 (Ying *et al.*, 2010) et Th2 sans perturber la polarisation Th1 (Ubaldi *et al.*, 2003).

c) PD-1/PD-L1 et PD-L2

La molécule PD-1 (CD279) est exprimée à la surface des cellules NK, des LB, des macrophages mais elle peut également être exprimée par certaines sous-populations de DC. Son expression à la surface des LT est induite lors de leur stimulation par le TCR (Simon & Labarriere, 2017). La molécule PD-1 peut lier les molécules PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*, CD274) et PD-L2 (*Programmed Death-Ligand 2*, CD273). L'engagement de la molécule PD-1 avec ses ligands aura pour conséquences, entre autres, d'inhiber la prolifération des LT, leur fonction cytotoxique mais aussi leur production de cytokines. PD-L2 est exprimé exclusivement par les CPA professionnelles alors que PD-L1 est exprimé par plusieurs types cellulaires, incluant notamment les LT, et l'interaction PD-1/PD-L1 est primordiale pour maintenir la tolérance périphérique (Riley, 2009). En effet, il a été montré que la molécule PD-L1 jouait un rôle majeur dans le développement des cellules iTreg. Elle permet d'améliorer et de soutenir l'expression du facteur de transcription FoxP3 ainsi que la fonction immunosuppressive de ces cellules régulatrices (Francisco *et al.*, 2009). Il a également été mis en évidence que la molécule PD-L1 pouvait interagir avec la molécule B7.1 pour inhiber la réponse des LT (Butte *et al.*, 2007).

d) ICOS/ICOSL

La molécule ICOS n'est pas exprimée de façon constitutive sur les LT au repos, mais elle est rapidement induite après l'engagement du TCR et/ou de CD28 (Wikenheiser & Stumhofer, 2016). ICOS se lie à la molécule ICOSL (*Inducible COStimulatory molecule Ligand*, CD275). Cette dernière se trouve principalement exprimée à la surface des CPA professionnelles (Collins *et al.*, 2005). De par son expression à la surface des LT présents au niveau des centres germinatifs (Tfh ; cf chapitre I, section B.1.f), la molécule ICOS joue un rôle essentiel dans la formation de ces structures, dans la commutation isotypique des Ig et plus généralement dans la régulation de l'immunité humorale (Dong *et al.*, 2001). Chez la souris, il a été mis en évidence que l'engagement d'ICOS améliorait la signalisation médiée par le récepteur à l'IL-4 et favorisait ainsi la différenciation en cellules Th2 (Watanabe *et al.*, 2005).

De plus, il a été montré que le blocage de l'interaction ICOS/ICOSL pendant la présentation de l'antigène provoquait une altération de la polarisation Th2 au profit des cellules Th1, entraînant la progression de maladies auto-immunes (Rottman *et al.*, 2001). ICOS joue un rôle essentiel dans la différenciation des LT CD4⁺ (exemple de polarisation Th2 décrit ci-dessus). Ce rôle a notamment été illustré dans le développement de réponses Th17 via l'activation de la voie de signalisation PI3K (Gao *et al.*, 2012). En plus de son implication au premier plan dans la différenciation Tfh, ICOS a aussi été rapporté comme un régulateur majeur des réponses de type Th1 (Wikenheiser *et al.*, 2016) et comme étant associé au développement de certaines réponses Treg (Redpath *et al.*, 2013). ICOS joue donc un rôle complexe et primordial dans la différenciation des LT CD4⁺, dépendant principalement, dans un contexte infectieux, de la nature même de l'agent pathogène mais aussi de l'environnement immunitaire du site atteint (Wikenheiser *et al.*, 2016).

2) La superfamille des récepteurs au TNF (TNFRSF)

a) CD27/CD70

La molécule CD27 (TNFRSF7) est exprimée à faible niveau et de façon constitutive par les cellules T naïves. Elle présente un pic d'expression 48 heures suivant l'activation des LT. La molécule CD27 peut lier CD70, notamment exprimé par les CPA professionnelles (Croft, 2003, 2009). Cette interaction (CD27/CD70) a déjà été décrite comme sensibilisant les LT CD4⁺ naïfs à une polarisation vers un profil Th1. Elle permet d'induire l'expression de T-bet et du récepteur $\beta 2$ de l'IL-12 dans les cellules T CD4⁺ naïves (van Oosterwijk *et al.*, 2007). Il a également été démontré que l'interaction CD27/CD70 stimule la prolifération des LT ainsi que leur capacité à sécréter des cytokines (Hintzen *et al.*, 1995). La signalisation intracellulaire transmise par la molécule CD27 permet également de surexprimer la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (*B cell lymphoma-extra Large*) pour favoriser la survie des LT CD4⁺ (van Oosterwijk *et al.*, 2007).

b) HVEM/LIGHT

La molécule HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*, TNFRSF14, CD270) est exprimée, comme CD27, de façon constitutive sur les LT naïfs. Cependant, sa cinétique d'expression est différente. En effet, son expression se trouve diminuée suite à l'activation des LT et elle est réaugmentée plus tardivement (environ 4 jours après l'activation des LT) pour retrouver son niveau d'expression initial (Croft, 2003). La molécule HVEM peut lier la molécule LIGHT (*Lymphotoxin-like, exhibits Inducible expression, and competes with herpes simplex virus Glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed on T lymphocytes*, CD258). L'expression de LIGHT sur les LT activés est inversement proportionnelle à celle de HVEM. En effet, LIGHT est surexprimé après la phase d'activation des LT puis son expression diminue quand celle de HVEM augmente (Granger & Rickert, 2003). Il a été mis en évidence que l'interaction de HVEM avec LIGHT favorise la polarisation des cellules de type Th1 (Xu *et al.*, 2007). HVEM a également la capacité de se lier à la molécule BTLA (*B and T Lymphocyte Attenuator*, membre de la famille des SF-Ig). Les Treg exprimant HVEM vont ainsi pouvoir lier la molécule BTLA exprimée par les LT effecteurs, et, dans ce cas, réprimer leur fonction (del Rio *et al.*, 2010). HVEM est donc une molécule essentielle à la régulation de l'activation des LT. De plus, HVEM améliore également la prolifération, la production de cytokines et la survie des LT activés (Croft, 2003; Shui & Kronenberg, 2013).

c) OX40/OX40L

La molécule OX40 (TNFRSF4, CD134) est exprimée par les LT activés, préférentiellement CD4⁺. Elle présente un pic d'expression dans les 48 heures suivant leur activation. Son ligand, OX40L (*OX40 Ligand* ou CD252), est quant à lui exprimé, entre autres, par les CPA professionnelles (Croft, 2003, 2009). De nombreuses études ont montré que l'interaction OX40/OX40L contribuait à la polarisation des cellules T CD4⁺ vers un profil Th2 (Flynn *et al.*, 1998; Ohshima *et al.*, 1998; Akiba *et al.*, 2000; Salek-Ardakani *et al.*, 2003). Bien qu'OX40 soit principalement connu pour son rôle majeur dans la différenciation des cellules Th2, dans certaines conditions, cette molécule a déjà été rapportée comme impliquée dans la polarisation vers d'autres profils effecteurs (Magee *et al.*, 2012). Par exemple, plus récemment, elle a été présentée comme favorisant l'induction de cellules Th9 (Xiao *et al.*, 2012).

Cependant, il a aussi été montré dans plusieurs études qu'OX40 inhibait le développement des réponses Treg (So & Croft, 2007; Vu *et al.*, 2007; Kroemer *et al.*, 2007). Lors de la première stimulation des LT, la molécule OX40 est également importante car elle favorise leur amplification et leur survie (Song *et al.*, 2008b). Il a été démontré qu'elle peut induire la sécrétion d'IL-2 et l'expression de molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*).

d) 4-1BB/41BBL

La molécule 4-1BB (CD137, TNFRSF9) est exprimée par les LT activés, préférentiellement CD8⁺. Comme les molécules OX40 et CD70, elle présente un pic d'expression 48h après l'activation des LT. Son ligand, 4-1BBL (*4-1BB Ligand* ou *CD137 Ligand*), est, lui, notamment exprimé par les CPA professionnelles (Croft, 2003, 2009). Dans un modèle de souris déficientes en LT CD8⁺ et présentant des tumeurs viro-induites, il a été rapporté qu'un traitement par des agonistes de CD137 conduisait à une régression tumorale en reprogrammant des cellules Treg en LT CD4⁺ cytotoxiques spécifiques de la tumeur (Akhmetzyanova *et al.*, 2016). Après traitement avec des anticorps anti-CD137, certaines cellules Treg présentaient des fonctions et des marqueurs de LT auxiliaires cytotoxiques, comme l'expression de CD154 et de Eomes, mais également la production de granzyme B et de TNF- α . Pour preuve de leur fonctionnalité, ces cellules étaient capables d'éliminer les cellules tumorales. Il a également été suggéré que 4-1BB favoriserait la polarisation des cellules Th1 (Kim *et al.*, 1998). Des études ont rapporté que la molécule 4-1BBL, améliorait la prolifération, la production de cytokines et les fonctions effectrices des LT CD4⁺ activés exprimant 4-1BB (Cannons *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2002). La costimulation apportée par la molécule 4-1BB favorise la survie des LT (Hurtado *et al.*, 1997; Bukczynski *et al.*, 2003), notamment en surexprimant la protéine Bcl-xL et en limitant la mort cellulaire médiée par l'AICD (*Activation Induced Cell Death*). De plus, il a également été démontré que l'interaction 4-1BB/4-1BBL est très importante pour la formation des LT mémoires (Dawicki & Watts, 2004).

3) La famille des molécules TIM

Comparée aux autres familles de molécules de costimulation (SF-Ig et TNFRSF), la famille des molécules TIM est moins documentée en raison de sa découverte plus tardive, mais elle a également un rôle très important dans la régulation de l'activation et la différenciation des LT. Brièvement, il s'agit également de molécules de surface constituées d'une partie extracellulaire comprenant un domaine Ig variable (avec une partie N-terminale riche en cystéines) et un domaine mucine. Elles possèdent aussi une partie transmembranaire et une queue intracellulaire possédant des résidus tyrosine phosphorylables (sauf TIM-4), impliqués dans la transduction du signal. Chez l'homme, il existe trois molécules TIM (TIM-1, TIM-3 et TIM-4) alors qu'une molécule TIM supplémentaire (TIM-2) a été décrite chez la souris (Rodriguez-Manzanet *et al.*, 2009).

a) Voie TIM-1

La molécule TIM-1 est exprimée par les LT CD4⁺ activés. Après différenciation, les Th2 continuent de l'exprimer alors que les Th1 et les Th17 ne l'expriment plus ou très faiblement. TIM-1 peut aussi être exprimé par les cellules épithéliales rénales, les cellules mastocytaires et par quelques cellules B. Les ligands principaux de TIM-1 sont TIM-4, la phosphatidylsérine (phospholipide exprimé par les cellules mourantes), IgA λ et TIM-1 même. Par sa capacité à reconnaître la phosphatidylsérine, TIM-1 joue un rôle important dans la prise en charge des cellules apoptotiques (Kobayashi *et al.*, 2007). Il a été montré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal agoniste de TIM-1 sur des cultures *in vitro* de LT CD4⁺ permettait d'induire une augmentation de prolifération cellulaire et de la production d'IL-4 par les cellules différenciées en Th2. *In vivo*, l'injection de cet anticorps chez la souris (en plus de l'antigène) résultait en une meilleure prolifération des cellules T spécifiques, en une meilleure production d'IL-4 et d'IFN- γ par ces cellules et en une inhibition de la tolérance périphérique, conduisant ici au développement de réactions d'hyperréactivité des voies respiratoires induites par l'allergène (Umetsu *et al.*, 2005). Chez l'homme, TIM-1 correspond à un gène de susceptibilité à l'allergie et à l'asthme.

b) Voie TIM-2

La molécule TIM-2 (murine, car non présente chez l'homme) est exprimée par certaines cellules B et par les cellules épithéliales présentes au niveau du foie et des reins. Elle est surexprimée par les LT activés et cette expression est préférentiellement maintenue par les cellules Th2 (Chakravarti *et al.*, 2005). Les principaux ligands de TIM-2 sont SEMA4A (*SEMAphorin 4A*, molécule transmembranaire exprimée par les DC et les LB) et la ferritine-H (Kumanogoh *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005). Il a été mis en évidence dans plusieurs études que TIM-2 permettait de réguler négativement les réponses Th2. A titre d'exemple, il a été montré que bloquer les interactions de TIM-2 avec ses ligands entraînait une hyper-prolifération des LT et la production par ces cellules de cytokines Th2 ainsi que l'atténuation de pathologies auto-immunes médiées par les Th1 (Chakravarti *et al.*, 2005). Du fait de son expression préférentielle par les cellules Th2, il a été proposé que TIM-2 pourrait agir par un mécanisme de rétrocontrôle négatif pour moduler les réponses médiées par ces cellules (Rodriguez-Manzanet *et al.*, 2009).

c) Voie TIM-3

La molécule TIM-3 est exprimée par les cellules NK, les monocytes, les DC et par les lymphocytes Th1 et Th17. Elle n'est en revanche pas exprimée par les cellules Th2. Le ligand identifié de TIM-3 est la galectine-9, un membre de la famille des lectines de type S. La galectine-9 est principalement exprimée par les LT CD4⁺ naïfs et par les Treg. L'IFN- γ peut augmenter l'expression de galectine-9 (Imaizumi *et al.*, 2002). Plusieurs études ont bien illustré le fait que TIM-3, *via* les interactions avec son ligand, permettait d'inhiber les réponses pro-inflammatoires Th1 et Th17 et favorisait les réponses Treg (Sabatos *et al.*, 2003; Sánchez-Fueyo *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Seki *et al.*, 2008).

d) Voie TIM-4

Contrairement aux autres molécules TIM, TIM-4 n'est pas exprimé par les LT. Son expression est exclusivement restreinte aux CPA professionnelles (DC, macrophages). Il a été montré que TIM-4 pouvait lier TIM-1 (Meyers *et al.*, 2005). Il a notamment été mis en évidence que l'interaction de TIM-4 avec TIM-1 conduisait à la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en cellules Th2 (Liu *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que TIM-4, par une interaction avec une molécule autre que TIM-1 encore inconnue, inhibait la différenciation des LT CD4⁺ en cellules Th17 (Cao *et al.*, 2011). Tout comme TIM-1, de par sa capacité à reconnaître les phosphatidylsérines, TIM-4 joue un rôle important dans la clairance des corps apoptotiques (Kobayashi *et al.*, 2007).

C- Signal 3 : les cytokines

Les cytokines représentent le signal 3 d'activation lymphocytaire. Plusieurs cytokines sont impliquées dans l'activation et la différenciation des LT naïfs CD4⁺ en LT effecteurs ou régulateurs (*cf* chapitre I, section B.1 et 2), dont principalement :

- L'IFN- γ et l'IL-12 pour les cellules Th1
- L'IL-4 pour les cellules Th2
- L'IL-6 et le TGF- β pour les cellules Th17
- L'IL-2 et le TGF- β pour les cellules iTreg
- L'IL-6 et le TNF- α pour les cellules Th22
- L'IL-4 et le TGF- β pour les cellules Th9
- L'IL-2 et l'IL-15 pour les LT CD4⁺ cytotoxiques
- L'IL-6 et l'IL-21 pour les cellules Tfh

Seules les cytokines IL-2, IL-7 et IL-15, utilisées par notre groupe pour activer et amplifier des LT spécifiques d'antigène de tumeur (Dupel *et al.*, article en préparation), les plus étudiées dans les modèles pré-cliniques d'immunothérapie anti-cancéreux et maintenant disponibles en thérapeutique, seront décrites ci-dessous. Elles appartiennent à la famille de cytokines dont les récepteurs partagent la sous-unité CD132, aussi appelée chaîne γ c (*gamma chain*), composée des cytokines suivantes : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21. Les cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 sont bien connues pour être impliquées dans l'homéostasie des cellules T naïves et mémoires (Rochman *et al.*, 2009; Yamane & Paul, 2012). De par leurs rôles incontestables dans le *priming*, la survie, la prolifération, la différenciation des LT et dans les réponses T mémoires, ces trois cytokines possèdent un fort potentiel thérapeutique, notamment dans le cadre des cancers (Pulliam *et al.*, 2016).

1) L'IL-2

L'IL-2, principalement produite par les LT CD4⁺ activés au niveau des organes lymphoïdes secondaires, peut être considérée comme une cytokine essentielle pour le développement du SI et agit comme un véritable facteur de croissance. Au repos, certains LT peuvent exprimer les molécules CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2 et à l'IL-15) et CD132 (chaîne γ). Ces molécules peuvent former un récepteur dimérique d'affinité modérée pour l'IL-2.

La stimulation antigénique conduit à l'expression par les LT de la molécule CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) qui, en présence d'IL-2, va pouvoir s'associer aux molécules CD122 et CD132 pour former un récepteur trimérique de grande affinité pour cette cytokine (Rickert *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Les molécules CD122 et CD132 sont alors responsables de la signalisation cellulaire médiée par l'IL-2. Via plusieurs voies intracellulaires de signalisation mettant en jeu JAK-STAT (*JANus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription*), PI3K/Akt et MAPK, elles vont permettre l'induction de la transcription de gènes cibles de l'IL-2, comme l'*IL2RA* (codant CD25), pour moduler très finement les réponses immunitaires (Boyman & Sprent, 2012).

L'IL-2 est bien caractérisée comme étant impliquée dans la différenciation des cellules T effectrices et mémoires (Malek, 2008; Boyman & Sprent, 2012). Plusieurs études ont mis en évidence que l'IL-2 est impliquée dans la régulation des différents lignages T CD4⁺ effecteurs. Il a été démontré que l'IL-2 peut favoriser l'induction de la sous-unité β du récepteur à l'IL-12 ainsi que du facteur de transcription T-bet pour réguler la différenciation Th1 (Liao *et al.*, 2011). Il a aussi été démontré que l'IL-2, par l'intermédiaire de la voie STAT5, joue un rôle essentiel dans la polarisation Th2 en régulant l'expression du gène *Il4ra* codant la chaîne α du récepteur à l'IL-4 (Cote-Sierra *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2008). De plus, l'IL-2 peut participer à l'inhibition de la différenciation des cellules Tfh (Ballesteros-Tato *et al.*, 2012). L'IL-2 n'est pas simplement une cytokine importante pour le bon fonctionnement des réponses effectrices, elle participe également au développement et au maintien des cellules Treg (Malek, 2008). Elle tient aussi un rôle crucial lors des phases d'amplification et de contraction des LT, notamment en régulant le mécanisme d'AICD. En effet, l'IL-2 est capable d'induire l'expression de la molécule pro-apoptotique FasL et de diminuer l'expression de la molécule anti-apoptotique FLIP (*Flice-Like Inhibitory Protein*), conduisant ainsi à l'apoptose des LT suite à leur activation (Refaeli *et al.*, 1998).

2) L'IL-7

L'IL-7 n'est pas sécrétée par les LT. C'est un facteur de croissance hématopoïétique qui est principalement sécrété par les cellules stromales des organes lymphoïdes primaires et secondaires. Le récepteur de cette cytokine, exprimé par les LT et préférentiellement par les LT naïfs, est un hétérodimère composé de la molécule CD127 (chaîne α , IL-7R α) et de la molécule CD132 (Mazzucchelli and Durum, 2007). Plusieurs études ont mis en évidence un rôle essentiel de l'IL-7 dans la survie des LT. Il a déjà été montré que l'IL-7, par le biais de la voie STAT5, induisait l'expression de molécules anti-apoptotiques (Bcl-2 et Mcl-1, *induced Myeloid cell leukemia differentiation protein-1*) et inhibait celle de molécules pro-apoptotiques (Bad, *Bcl-2-associated death promoter*, Bid, *Bh3-interacting domain death agonist*, et Bim, *Bcl-2-interacting mediator of cell death*), favorisant ainsi la survie des LT naïfs (ElKassar & Gress, 2010). En outre, l'interaction de l'IL-7 avec son récepteur est aussi capable de réguler l'expression du facteur de transcription FoxO1 (*Forkhead box O1*), essentiel pour l'homéostasie des LT naïfs (Ouyang *et al.*, 2009).

Il a déjà été démontré que l'IL-2, par une signalisation PI3K/Akt dépendante, peut diminuer l'expression de l'IL-7R α à la surface de ces cellules entraînant une diminution d'expression du récepteur à l'IL-7 par les LT activés, mais qu'en revanche, elle augmente l'expression de la chaîne α des récepteurs à l'IL-4 et à l'IL-15. De plus, l'IL-15, dont le récepteur est très proche structurellement de celui de l'IL-2 (mêmes chaînes β et γ), est elle aussi capable de diminuer l'expression de l'IL-7R α (Xue *et al.*, 2002). L'IL-7 a également été identifiée comme favorisant le passage des cellules T CD4⁺ effectrices à des cellules T CD4⁺ mémoires, notamment en apportant des signaux de survie (Li *et al.*, 2003). En effet, l'IL-7, toujours *via* des voies de signalisation JAK/STAT, est également capable de réguler à la hausse des protéines anti-apoptotiques (Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2) pour améliorer la survie des LT CD4⁺ effecteurs mémoires (Chetoui *et al.*, 2010). Plus récemment, il a aussi été mis en évidence, chez la souris, que les lymphocytes Treg mémoires localisés au niveau des ganglions lymphatiques drainant la peau, exprimaient à un niveau élevé le récepteur à l'IL-7 et que cette dernière était requise pour le maintien des Treg dans les tissus périphériques (Gratz *et al.*, 2013).

3) L'IL-15

L'IL-15 est principalement produite par les CPA professionnelles, et elle se caractérise par son rôle essentiel dans le développement et le maintien des réponses T CD8⁺ mémoires ainsi qu'à sa contribution dans l'homéostasie des cellules NK et T $\gamma\delta$. Le récepteur à l'IL-15 est un hétérotrimère composé d'une chaîne spécifique α (IL-15R α , CD215), d'une chaîne β qu'il partage avec l'IL-2 (IL-2/15R β , CD122) ainsi que de la chaîne γ_c (CD132).

On recense actuellement trois modes d'actions de l'IL-15 sur les LT : (i) un mode d'action indirect *via* une production autocrine (mentionné ci-avant) qui, notamment en modulant l'activation des CPA professionnelles, va réguler finement l'activation des LT ; (ii) un mode d'action direct par l'interaction de l'IL-15 avec son récepteur exprimé à la surface des LT ; (iii) un mode d'action par trans-présentation de l'IL-15 : l'IL-15 sécrétée de façon paracrine ou autocrine va lier l'IL-15R α présent à la surface des cellules productrices puis être trans-présentée au récepteur CD122/CD132 présent à la surface des LT (Schluns & Lefrançois, 2003).

L'IL-15 peut aussi moduler les réponses T CD4⁺. Chez la souris, il a été mis en évidence que cette cytokine pouvait potentialiser l'effet de l'IL-7 pour promouvoir la prolifération et la survie des LT CD4⁺ mémoires (Lenz *et al.*, 2004). Une autre étude a par lui suite confirmé que l'homéostasie des LT CD4⁺ mémoires était aussi bien dépendante de l'IL-7 que de l'IL-15 (Purton *et al.*, 2007). En outre, l'IL-15 a également la capacité d'inhiber l'AICD induite par l'IL-2, favorisant ainsi la survie des cellules CD4⁺ (Marks-Konczalik *et al.*, 2000). Il a aussi été rapporté que l'IL-15 pouvait rendre les LT effecteurs (CD8⁺ et CD4⁺) résistants aux fonctions suppressives des cellules Treg *via* l'activation de la voie de signalisation PI3K (Ben Ahmed *et al.*, 2009). De plus, l'IL-15 est une cytokine clé de la réponse T CD4⁺ cytotoxique, en renforçant notamment les fonctions effectrices cytolytiques des lymphocytes impliqués dans cette réponse (Mucida *et al.*, 2013).

Chapitre III – Nature des antigènes tumoraux

Les antigènes de tumeur peuvent être subdivisés en deux groupes en fonction de leur profil d'expression : (i) les antigènes partagés, exprimés par les cellules saines mais aussi par les cellules tumorales et (ii) les antigènes viraux et les antigènes issus de gènes mutés (néoantigènes), exprimés uniquement par les cellules tumorales (Finn, 2017). L'avantage des antigènes fréquemment exprimés est qu'ils possèdent un potentiel intéressant pour être utilisés dans le cadre de stratégies vaccinales préventives. En revanche, si l'expression de ces antigènes ne se limite pas au tissu tumoral, leur utilisation comme cibles en immunothérapie peut conduire à une réaction auto-immune (June, 2007). De par leur expression restreinte aux cellules tumorales, les néoantigènes représentent de bonnes cibles en thérapeutique, notamment pour s'affranchir d'effets indésirables de type auto-immun. Un grand nombre d'épitopes CD4 et CD8 sont décrits et recensés par le site *Cancer Antigenic Peptide Database* (<https://caped.icp.ucl.ac.be/Peptide/list>). Par souci de concision, seuls quelques exemples seront donnés ci-dessous.

A- Les antigènes partagés

1) Les antigènes de différenciation

L'expression des antigènes de différenciation est restreinte aux tumeurs et aux tissus sains dont ils dérivent. En ce qui concerne les réponses T CD4⁺, ils sont majoritairement exprimés dans le mélanome. Un des premiers qui a été bien caractérisé dans le mélanome est l'antigène Melan-A/MART-1. Plusieurs épitopes dérivés de cet antigène ont été décrits tels que Melan-A₂₅₋₃₆ et Melan-A₂₇₋₄₀, présentés respectivement au sein des molécules HLA-DQ6 et HLA-DR1 par des cellules tumorales (Bioley *et al.*, 2006). D'autres antigènes de différenciation ont également été trouvés dans les cancers colorectaux, tels que l'antigène ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) pour lequel les trois épitopes ACE₄₂₅₋₄₃₇, ACE₆₆₆₋₆₇₈ et ACE₅₆₈₋₅₈₂ ont été respectivement décrits dans le contexte HLA-DR7, HLA-DR14 et HLA-DR3 (Crosti *et al.*, 2006). Ces épitopes fournissent ainsi de nouvelles cibles pour développer des stratégies d'immunothérapie dans le cadre des tumeurs solides.

2) Les antigènes CT (*Cancer Testis*) ou antigènes germinaux

Les antigènes CT sont exprimés dans les tissus tumoraux, mais ne le sont pas, en revanche, dans les tissus sains, à l'exception du placenta et des cellules germinales testiculaires. Ils résultent de la réactivation au sein de la tumeur de gènes normalement réprimés ou silencieux dans les tissus adultes, suite à une déméthylation de leur promoteur (De Smet *et al.*, 1994, 1999; Krishnadas *et al.*, 2013). Les cellules placentaires et germinales testiculaires n'exprimant pas de molécules du CMH-I et du CMH-II, ces antigènes sont donc spécifiquement présentés à la surface des cellules tumorales. Ils présentent ainsi un grand intérêt en immunothérapie. Dans cette catégorie d'antigènes, on peut citer l'antigène NY-ESO-1 découvert par l'équipe de Loyd Old (Chen *et al.*, 2004; Mandic *et al.*, 2005; Mizote *et al.*, 2010) mais aussi ceux appartenant à la famille MAGE (*Melanoma-associated AntiGEN*) dont le premier a été découvert par l'équipe de Thierry Boon (Cesson *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2001; Schultz *et al.*, 2004) pour lesquels plusieurs épitopes restreints aux molécules HLA-II ont été décrits. Fait important, des LT CD4⁺ spécifiques des antigènes NY-ESO-1 et MAGE-3 ont été dernièrement utilisés avec succès en immunothérapie, pour traiter respectivement des patients atteints de mélanome métastatique (Hunder *et al.*, 2008) ainsi que des patients présentant d'autres types de tumeurs solides (Lu *et al.*, 2017).

3) Les antigènes surexprimés

Les antigènes surexprimés sont exprimés à un faible niveau par les tissus sains et sont surexprimés par les cellules tumorales. Leur surexpression dans les tumeurs peut initier une réponse anti-tumorale par rupture de la tolérance. Parmi les antigènes appartenant à cette catégorie, on peut citer MELOE-1 (*MELanoma OverExpressed antigen-1*) qui est surexprimé dans les mélanomes. Plusieurs épitopes de MELOE-1 présentés par les molécules HLA-II ont été caractérisés et rapportés, permettant de générer *in vitro* des lymphocytes Th1 capables de stimuler l'activité de LTC spécifiques anti-tumoraux (Rogel *et al.*, 2011; Bobinet *et al.*, 2012). On peut également citer l'antigène hTERT (*human TElomerase Reverse Transcriptase*), surexprimé dans plus de 90% des cancers (Leão *et al.*, 2018). Plusieurs épitopes dérivés de hTERT, reconnus par les LT CD4⁺, ont été découverts (Schroers *et al.*, 2002, 2003a; Galaine *et al.*, 2016). Certains de ces épitopes sont notamment utilisés en thérapeutique pour développer des stratégies vaccinales dans le cadre des cancers pancréatiques et pulmonaires avancés (Kyte, 2009).

B- Les antigènes viraux et les néoantigènes

1) Les antigènes viraux

Les tumeurs viro-induites sont capables d'exprimer des antigènes pouvant être reconnus par le SI. Ici, on peut citer le virus HPV (*Human Papilloma Virus*), notamment impliqué dans les cancers oropharyngés et les cancers du col de l'utérus. Dans une cohorte de patientes présentant un cancer du col de l'utérus, il a été rapporté que des réponses T CD4⁺ spécifiques de l'oncoprotéine E6 du virus HPV-16 étaient associées à une régression tumorale (Kim *et al.*, 2012). On peut aussi citer l'exemple des infections dues à l'EBV associées à certains lymphomes B dans lesquels des LT CD4⁺, en répondant spécifiquement à des antigènes viraux tels que EBNA1 (*Epstein-Barr Nuclear Antigen 1*), permettent la destruction des cellules tumorales (Paludan *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2015).

2) Les néoantigènes

Les néoantigènes résultent des mutations portées par les cellules tumorales. De ce fait, ils sont spécifiques des tumeurs. Ils sont majoritairement issus de mutations ponctuelles, de mutations décalant le cadre de lecture (*frameshift*) mais aussi de translocations chromosomiques qui aboutissent à la formation de protéines de fusion, retrouvées par exemple dans les leucémies (Sun *et al.*, 2017).

La charge en néoantigènes est corrélée à la charge en mutations somatiques portées par les cellules tumorales. Parmi les cancers présentant les plus forts taux de mutations, on retrouve : les mélanomes, les cancers du col de l'utérus, les cancers du poumon mais aussi les cancers colorectaux (Alexandrov *et al.*, 2013). Grâce à une véritable révolution dans le domaine des nouvelles techniques de séquençage à haut-débit (NGS, *Next Generation Sequencing*) telles que le *RNA sequencing* et le *whole exome sequencing*, il est désormais possible de caractériser des néoantigènes dans plusieurs types de cancers (Schumacher and Schreiber, 2015). De plus, avec l'apparition de nouveaux logiciels de prédiction de liaison des peptides aux molécules du CMH-II, il est maintenant possible de prédire les néoantigènes les plus immunogènes. Ces logiciels de prédiction prennent notamment en compte la longueur des néopeptides présentés et les motifs qui les constituent ainsi que leur affinité pour les poches HLA (Syfpeithi, NetMHC, Bimas, Rankpep).

Ces outils permettent donc d'identifier et de sélectionner les meilleurs néoantigènes à cibler pour le développement de nouvelles immunothérapies.

Il a été démontré que la reconnaissance des néoantigènes par les LT CD4⁺ était fréquente chez les patients atteints de mélanome (Linnemann *et al.*, 2015). Des néoantigènes contenant des épitopes restreints à des molécules HLA-II et issus de mutations des oncogènes *BRAF* (substitution V600E) et *KRAS* (substitutions G12V, G12R, G12K, et G12A) sont bien caractérisées (Gedde-Dahl *et al.*, 1992, 1994; Nishimura *et al.*, 2004; Sharkey *et al.*, 2004). Dans les lymphomes, une étude a permis de mettre en évidence le fait que les néoantigènes dérivant de mutations des Ig étaient majoritairement reconnus par les LT CD4⁺ (Khodadoust *et al.*, 2017). Des néoantigènes reconnus par les LT CD4⁺ ont également été identifiés dans les adénocarcinomes du poumon notamment issus de mutations des gènes *TP53*, *KRAS*, *MUC16*, *STK11* et *EGFR* (Cai *et al.*, 2018), dans les cholangiocarcinomes issu de la mutation E805G du gène *ERBB2IP* (Tran *et al.*, 2014), mais également dans les gliomes issu de la mutation R132H du gène *IDH1* (Schumacher *et al.*, 2014).

Les mutations engendrant un décalage du cadre de lecture peuvent aussi conduire à la production de nouveaux peptides antigéniques. Dans les cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire, la perte de fonction du système MMR (*DNA MisMatch Repair system*), système de réparation de l'ADN, peut être à l'origine d'insertions ou de délétions au niveau de courtes séquences répétées codantes de l'ADN. Ces mutations aboutissent à un décalage du cadre de lecture et à la génération de néoprotéines et de néopeptides (*frameshift peptides*). Une étude a permis de mettre en évidence une mutation décrite comme immunogène, issue de la délétion d'une adénine (-1A) au sein d'une séquence codante de 9A dans le gène du récepteur du TGF-β de type II (*TGFβRII* (-1A)). Cette mutation génère un néopeptide qui est reconnu par les LT CD4⁺. Des LT CD4⁺ spécifiques de ce néoantigène peuvent être retrouvés dans la tumeur (Sæterdal *et al.*, 2001).

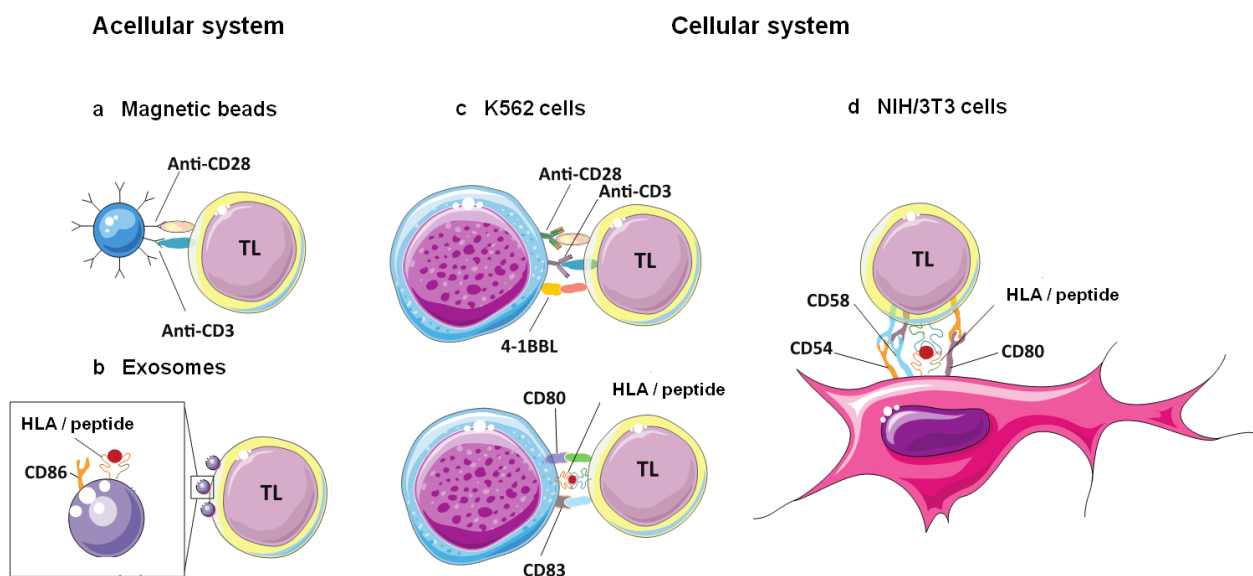
Chapitre IV- Stratégies d'immunothérapie cellulaire dans les cancers : rôle majeur des LT CD4⁺

- **Rôle de soutien des LT CD4⁺ aux réponses T cytotoxiques**

Les LT sont subdivisés en deux grandes populations : les LT CD8⁺ cytotoxiques et les LT CD4⁺ auxiliaires. Ces derniers peuvent être considérés comme de véritables « chefs d'orchestre » de la réponse immunitaire spécifique. En effet, par une interaction directe avec les autres cellules immunitaires ou par la sécrétion de diverses molécules, ils soutiennent notamment les réponses T CD8⁺ anti-tumorales.

Les LT CD4⁺ sont tout d'abord nécessaires pour activer pleinement les DC, considérées comme les CPA les plus efficaces *in vivo* pour activer les LT CD8⁺. Les interactions CD40L (*CD40 Ligand*)-CD40 entre les LT CD4⁺ activés et les DC sont essentielles pour la maturation des DC en augmentant leurs capacités de présentation de l'antigène et de costimulation (Laidlaw *et al.*, 2016). De plus, les interactions entre les LT CD4⁺ activés et les DC conduisent à la production de chimiokines qui facilitent le recrutement de cellules T CD8⁺ naïves dans les organes lymphoïdes secondaires (Castellino *et al.*, 2006). Il a également été récemment montré que les LT CD4⁺ régulaient positivement l'expression de CD70 sur les DC, une molécule costimulatrice qui se lie au récepteur CD27 sur les LT CD8⁺. Les interactions CD70-CD27 entraînent la délivrance d'un signal qui amplifie les fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺, notamment en régulant négativement l'expression du marqueur d'épuisement cellulaire PD-1 (Ahrends *et al.*, 2017). Par ailleurs, les LT CD4⁺ sont également impliqués dans la réponse mémoire et la survie des LT CD8⁺. En effet, la production d'IL-2 par les cellules CD4⁺ auxiliaires pendant la phase de *priming* est cruciale pour une réponse CD8⁺ secondaire efficace (Williams *et al.*, 2006). Les LT CD4⁺ stimulent également la production d'IL-15 par les DC, ce qui favorise la survie des LT CD8⁺ en diminuant l'expression de la molécule pro-apoptotique Bax (*Bcl-2-associated x protein*) et en augmentant l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-xL (Oh *et al.*, 2008).

Il a également été rapporté que les LT CD8⁺ qui s'activaient et se différenciaient sans l'aide des LT CD4⁺, présentaient une survie à long terme ainsi qu'une capacité de prolifération réduites lors de la restimulation. Les LT CD8⁺, via la molécule TRAIL (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) qu'ils expriment rapidement après restimulation, sont rapidement éliminés par un mécanisme de mort cellulaire induite par l'activation, ou AICD (Laidlaw *et al.*, 2016).



D'après Kim *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2004

Figure 11 : Systèmes artificiels d'activation lymphocytaire

Afin d'activer plus efficacement des LT *in vitro*, des systèmes artificiels de stimulation ont été développés. Il existe des systèmes acellulaires (a et b) et des systèmes cellulaires (c et d).

a. Les systèmes acellulaires peuvent être composés de billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. **b.** D'autres systèmes acellulaires sont composés d'exosomes, qui vont exprimer à leur surface des complexes CMH/peptide, mais aussi des molécules de costimulation (ici, CD86) **c.** (Panel du haut) Les systèmes cellulaires peuvent être basés sur l'utilisation de cellules K562. Ces cellules peuvent avoir été transduites avec la molécule CD32, qui va permettre de fixer la partie Fc (Fragment cristallisable) des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, mais aussi avec la molécule 4-1BBL pour renforcer le signal de costimulation. (Panel du bas) Ces cellules peuvent également avoir été transduites avec une molécule HLA et des molécules de costimulation (CD80 et CD83), puis chargées avec un antigène d'intérêt. **d.** Un autre système cellulaire repose sur l'utilisation de cellules NIH/3T3 transduites par exemple, avec une molécule HLA, une molécule de costimulation (CD80), des molécules d'adhérence (CD54 et CD58) et un antigène d'intérêt.

A- Systèmes artificiels de présentation de l'antigène pour activer des LT CD4⁺ humains

Une des principales étapes limitantes pour stimuler efficacement des LT CD4⁺ en vue d'une ICA (Immunothérapie Cellulaire Adoptive) est l'obtention d'un nombre suffisant de cellules fonctionnelles, après amplification par des CPA autologues, rapidement disponibles. *In vivo*, les DC sont les CPA les plus efficaces pour activer les LT, mais, *in vitro*, leur génération présente des difficultés en termes de quantité et de standardisation phénotypique et fonctionnelle. Pour contourner ces difficultés, des systèmes artificiels de présentation de l'antigène ont été développés (**Figure 11**). Il existe actuellement des systèmes acellulaires et des systèmes cellulaires qui permettent de stimuler des LT CD4⁺, spécifiques d'antigène ou pas (Kim *et al.*, 2004).

1) Systèmes acellulaires de présentation de l'antigène

a) Les billes magnétiques

Des billes magnétiques portant des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 à leur surface ont déjà été rapportées pour avoir amplifié avec succès des LT CD4⁺ polyclonaux issus de donneurs infectés par le HIV (Levine *et al.*, 1998). Le transfert adoptif de ces cellules aux patients était bien toléré, et entraînait une augmentation du nombre de LT CD4⁺ *in vivo* (Levine *et al.*, 2002). Dans le cadre des cancers, des LT amplifiés par des billes anti-CD3/anti-CD28 (et donc de façon non spécifiques) ont déjà été utilisés dans des essais cliniques de phase I, en combinaison avec de l'IL-2, pour traiter des carcinomes rénaux métastatiques. Cependant, aucune réponse clinique, complète ou partielle, n'a pu être observée (Thompson *et al.*, 2003).

Des stratégies reposant sur l'utilisation de billes magnétiques pour permettre l'activation de LT spécifiques d'antigène ont aussi été développées. Pour ce faire, en plus de l'anticorps anti-CD28, les billes avaient été recouvertes de complexes tétramériques HLA-peptide *via* un anticorps anti-HLA-II. Il a été démontré que ces billes magnétiques étaient capables d'activer spécifiquement des LT CD4⁺ contre un antigène de la grippe (Maus *et al.*, 2003). Même si les billes magnétiques représentent un premier système permettant d'apporter les signaux nécessaires pour stimuler des LT, leur capacité de stimulation reste néanmoins insuffisante comparativement à celle des CPA.

b) Les liposomes et les exosomes

Les liposomes sont des vésicules lipidiques composées de phosphatidylcholine et de cholestérol dans lesquelles peuvent être incorporés des complexes CMH-II/peptide. Ils ont déjà été utilisés chez la souris pour identifier et stimuler des LT CD4⁺ spécifiques de l'OVA (OVAAlbumine), mais aussi pour mieux caractériser les interactions entre molécules présentes au niveau de la synapse immunologique, notamment les interactions entre les complexes CMH-II/peptide et les TCR (Prakken *et al.*, 2000).

D'autres types de vésicules lipidiques, les immunosomes, ont également été rapportés dans la littérature. Ils résultent du bourgeonnement de cellules HEK293 qui ont été transduites avec des versions modifiées d'un scFv (*single chain Fragment variable*) dérivé de l'anticorps OKT3 (anti-CD3) et avec la molécule de costimulation CD80 (Derdak *et al.*, 2006). Cependant, les difficultés inhérentes à leur production ont été un frein à leur développement en thérapeutique.

Les exosomes (décrits dans le chapitre II, section A.4.b), de par l'expression de complexes CMH-II/peptide ainsi que de molécules de costimulation à leur surface, représentent également un système de présentation de l'antigène très attractif, qui peut être optimisé dans le but de stimuler des LT CD4⁺ spécifiques, notamment dans le cadre des cancers (Liu *et al.*, 2015).

2) Systèmes cellulaires de présentation de l'antigène

a) Les cellules présentatrices d'antigène artificielles allogéniques

Les cellules K562 sont une lignée de cellules érythroleucémiques humaines déficientes pour les molécules HLA-I et HLA-II classiques, ainsi que pour les molécules Ii et HLA-DM. En revanche, elles expriment les molécules d'adhérence CD54 (ICAM-1) et CD58 (LFA-3). Initialement, les cellules K562 ont été utilisées comme CPAA (Cellules Présentatrices d'Antigène Artificielles) par l'équipe du Pr Carl June (Maus *et al.*, 2002). Elles avaient été transfectées avec la molécule CD32 humaine, un récepteur de type Fcγ, afin qu'elles puissent fixer des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, mais également avec la molécule de costimulation 41BB-L, pour amplifier des LT polyclonaux de façon non spécifique.

Le groupe du Pr Hirano les a ensuite utilisées comme CPAA de classe II (CPAA-II), afin d'induire des réponses T CD4⁺ spécifiques d'antigènes (Butler *et al.*, 2010). Pour ce faire, ils avaient modifié génétiquement les cellules K562 pour qu'elles expriment les molécules de costimulation CD80 (B7.1) et CD83 ainsi qu'une molécule HLA-DR. Ces cellules avaient également été transduites avec les molécules Ii et HLA-DM pour favoriser la présentation d'un antigène exogène. Ces CPAA-II étaient capables d'amplifier des LT CD4⁺ mémoires centraux de phénotype Th1, spécifiques d'antigènes infectieux tels que la toxine tétanique, HA, et pp65 (antigène du CMV, CytoMégaloVirus), sans expansion de Treg. Les cellules K562 ont l'inconvénient de présenter de très faibles capacités d'endocytose. L'expression après transfert de gène de la molécule CD64 (un autre récepteur Fc) permet l'endocytose des antigènes sous forme de complexes immuns et la stimulation de réponses T CD4⁺ spécifiques. Dans une autre étude, les CPAA-II dérivant de cellules K562 mais exprimant des molécules HLA-DP ont été utilisées pour amplifier des LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène de tumeur survivine (Tanaka *et al.*, 2011). Ces CPAA-II induisent des effecteurs de types Th1 et Th2 ayant des caractéristiques de cellules mémoires à long terme.

b) Les cellules présentatrices d'antigène artificielles xénogéniques

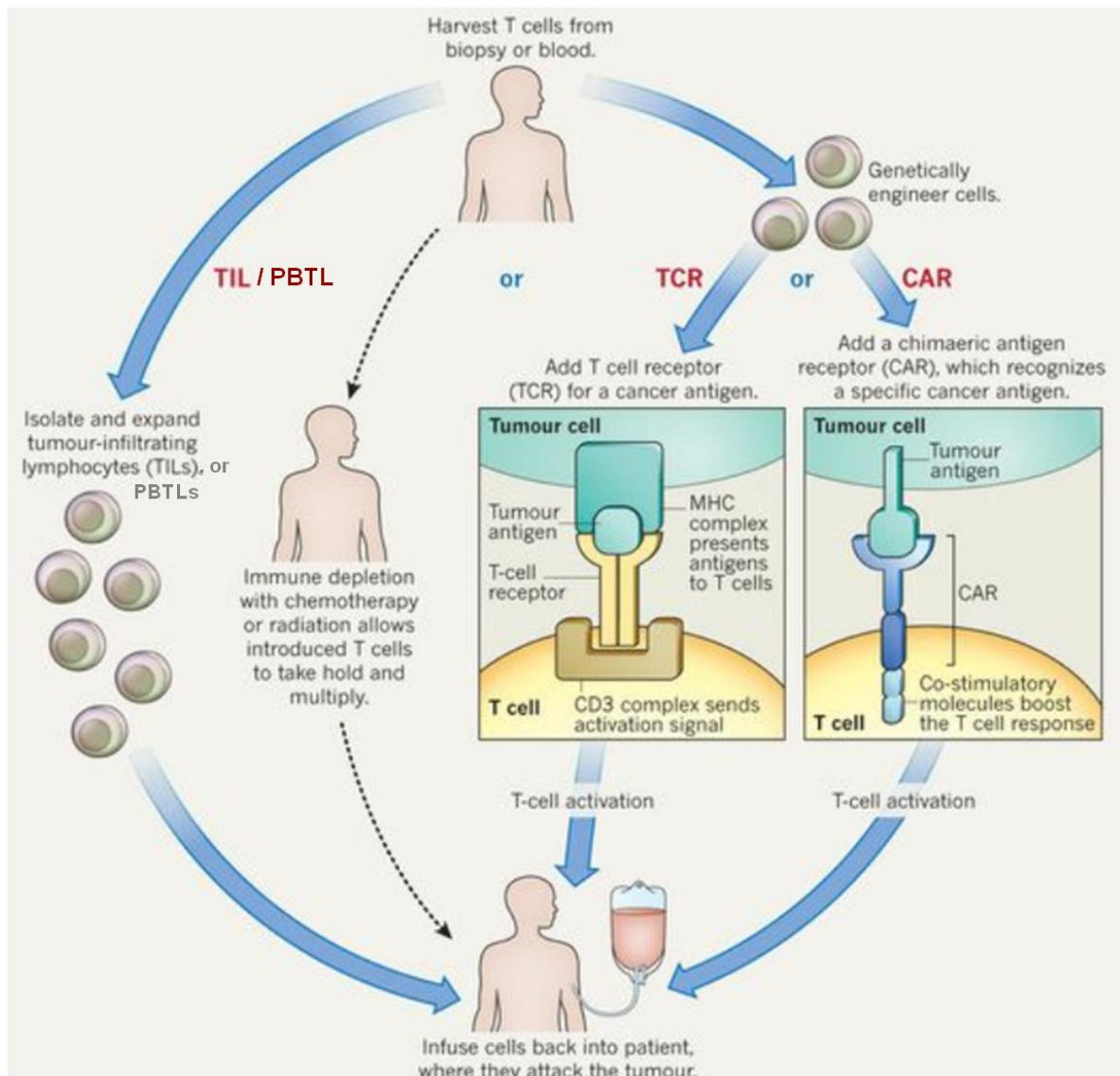
Notre groupe a également développé un modèle de CPAA xénogéniques basées sur l'utilisation de fibroblastes murins NIH/3T3 transduits avec des vecteurs gamma-rétroviraux pour exprimer une molécule HLA et des molécules accessoires, comme la molécule de costimulation CD80 et les molécules d'adhérence CD54 et CD58. Ces cellules présentent de nombreux avantages : elles s'amplifient rapidement, leurs transduction est facile, entraînant une expression élevée et stable des transgènes.

Initialement, des CPAA de classe I (CPAA-I), exprimant la chaîne lourde de la molécule HLA-A*02:01 et la β 2-microglobuline ainsi qu'un antigène peptidique ou protéique d'intérêt ont été mises au point (Latouche & Sadelain, 2000; Papanicolaou *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2005). Ces cellules sont capables de dégrader des antigènes protéiques endogènes « entiers » et de présenter des peptides qui en sont dérivés au sein des molécules HLA-I, dans le but d'activer spécifiquement des LT CD8⁺. Elles sont tout aussi efficaces, *in vitro*, que des DC ou des cellules B-EBV pour stimuler et amplifier des LT CD8⁺ fonctionnels, spécifiques d'antigènes viraux et tumoraux.

Au sein de notre groupe, des CPAA-I exprimant des antigènes tumoraux ont été générées pour, *in vitro*, activer et amplifier efficacement et spécifiquement des LT cytotoxiques, notamment chez des patients atteints de cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire (Maby *et al.*, 2015 ; Kora *et al.*, article en préparation, annexe I). Les CPAA-I, déclinables selon le contexte HLA du patient (Hasan *et al.*, 2009), représentent un outil très intéressant pour : (i) *monitorer* des réponses lymphocytaires T CD8⁺; (ii) étudier précisément le rôle des différents éléments de la synapse immunologique dans l'activation des LT CD8⁺, notamment quant à leur implication dans l'obtention de sous-populations de LT particulières, comme celle des LT_{SCM} (Dupel *et al.*, article en préparation); (iii) caractériser des épitopes immunogènes d'intérêt thérapeutique, après immunoprécipitation des complexes HLA-I/peptide et analyse par spectrométrie de masse des peptides élués (Kora *et al.*, article en préparation).

Par la suite, sur le modèle des CPAA-I, nous avons généré des CPAA-II exprimant une molécule HLA-DR. Nous avons montré dans une première étude que ces cellules présentaient efficacement des peptides après chargement exogène, à un niveau même plus élevé que des cellules B-EBV (Garnier *et al.*, 2016). Ces CPAA sont capables d'endocyter et de dégrader un antigène protéique « entier » exogène, et de présenter un épitope d'intérêt qui en dérive à des LT CD4⁺ spécifiques. En stimulation primaire, elles amplifient des LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène HA à partir de cellules de donneurs sains, mais à un niveau moindre que des CPA autologues. Une réponse non spécifique importante est observée après cette première stimulation de LT CD4⁺ par les CPAA-II. L'hypothèse privilégiée pour expliquer ce phénomène est la présentation de peptides dérivés d'antigènes présents dans le milieu de culture ou de peptides murins par les molécules HLA-DR. Néanmoins, ces CPAA-II sont plus efficaces que des CPA autologues en stimulation secondaire. Les LT CD4⁺ spécifiques amplifiés par ces CPAA-II sont essentiellement des effecteurs Th1 fonctionnels de types T_{TM} et T_{EM}.

L'apport des CPAA-II dans l'obtention de LT CD4⁺ pouvant être utilisés en ICA a fait l'objet d'une revue scientifique (Couture *et al.*, revue prochainement soumise à *Frontiers in Immunology*, annexe II).



D'après Humphries, *Nature*, 2013

Figure 12 : Immunothérapie cellulaire adoptive anti-tumorale

Plusieurs stratégies d'ICA anti-tumorales ont été développées au cours de ces dernières années. Il existe une approche basée sur l'utilisation de LT autologues naturellement anti-tumoraux présents dans la tumeur du patient (TIL) ou provenant du sang périphérique (PBTL, *Peripheral Blood T Lymphocytes*). Ces LT sont isolés, activés puis amplifiés *in vitro* avant d'être réinjectés au patient. Deux autres stratégies d'ICA sont basées sur l'utilisation de LT autologues génétiquement modifiés. La première consiste à transduire les LT du patient avec un TCR transgénique, spécifique d'un antigène de tumeur présenté sous forme de peptide au sein d'une molécule HLA, tandis que la seconde repose sur la transduction des LT avec un récepteur chimérique (CAR), spécifique d'un antigène « entier » exprimé à la surface des cellules tumorales.

B- Immunothérapie cellulaire adoptive dans les cancers

Différents critères ont été définis pour prédire l'efficacité de l'ICA : il s'agit des *FRESH criteria* (*Function, Remanence, Expansion, Survival, Homing*) établis par le groupe du Pr Michel Sadelain (Sadelain *et al.*, 2003). Ils reposent sur le fait que *in vivo* : (i) la spécificité et la fonctionnalité des LT doivent être maintenues (*Function*), (ii) les LT doivent permettre une réponse mémoire à long terme (*Remanence*), (iii) les LT doivent pouvoir s'amplifier de façon contrôlée (*Expansion*), (iv) les LT doivent se trouver dans des conditions favorisant leur survie (*Survival*) et (v) les LT doivent aussi avoir la capacité de migrer jusqu'à la tumeur afin d'exercer leur activité anti-tumorale (*Homing*).

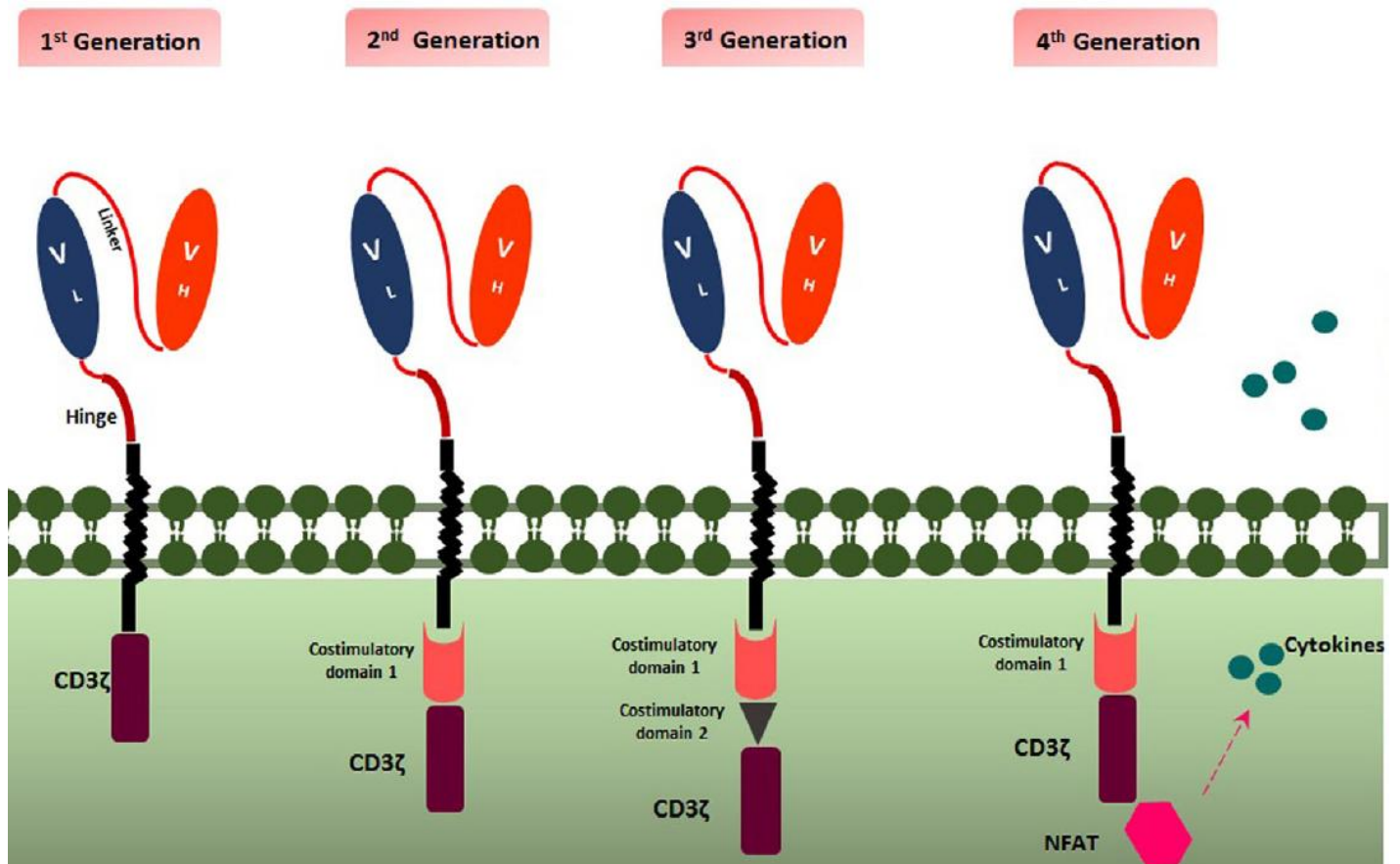
L'ICA anti-tumorale repose sur une première étape d'activation et d'amplification *in vitro* de LT spécifiques, issus du sang périphérique ou ayant infiltré la tumeur (Restifo *et al.*, 2012). La seconde étape consiste à réinjecter ces LT aux patients après avoir évalué leur spécificité, leur fonctionnalité et leur phénotype. Ces stratégies d'ICA sont basées sur l'utilisation de LT autologues non modifiés, naturellement anti-tumoraux, ou modifiés génétiquement par transfert de gène pour exprimer un CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) ou un TCR transgénique spécifique d'antigène de tumeur (**Figure 12**). Bien que l'efficacité de ce type de thérapie ait été initialement mis en évidence pour des LT CD8⁺ (Dudley & Rosenberg, 2003), les LT CD4⁺ sont apparus ensuite comme étant des acteurs cellulaires importants dans le cadre de l'ICA.

1) Les LT non modifiés

Lors d'une étude pionnière menée par Kahn et collaborateurs, un modèle murin de mélanome exprimant l'antigène humain p97 a été développé (Kahn *et al.*, 1991). Il a été montré que le transfert adoptif de clones de cellules T CD4⁺ spécifiques de p97 chez ces souris favorisait l'éradication des tumeurs. Ces LT CD4⁺ agissaient indirectement, sans contribution de LT CD8⁺, en sécrétant des cytokines recrutant des effecteurs de l'immunité innée tels que les macrophages, capables de détruire les cellules tumorales.

Une preuve de concept de l'intérêt de l'utilisation de LT CD4⁺ spécifiques d'antigènes de tumeurs en clinique a ensuite été établie par Hunder et collaborateurs (Hunder *et al.*, 2008). Ces derniers ont isolé et amplifié *in vitro* des clones de cellules T CD4⁺ autologues spécifiques de NY-ESO-1, provenant d'un patient réfractaire atteint d'un mélanome métastatique. Après une injection de 5 milliards de ces cellules, le patient présentait une rémission clinique durable qui se reflétait par des réponses contre NY-ESO-1 mais aussi contre d'autres antigènes de mélanome exprimés par la tumeur comme MART-1 et MAGE-3.

Par la suite, un cas intéressant de cholangiosarcome métastatique traité par transfert adoptif de LT CD4⁺ infiltrant la tumeur (TIL), spécifiques d'un néoantigène, a été rapporté par Tran et collaborateurs (Tran *et al.*, 2014). Ces derniers ont identifié des TIL, au profil Th1, spécifiques d'un néoantigène qui dérivait de la protéine ERBB2IP (*ERBB2 Interacting Protein*). Dans un premier temps, le patient a reçu une injection de 42 milliards de cellules contenant 25% de cellules Th1 spécifiques de ce néoantigène, ce qui a conduit à une stabilisation de la maladie pendant plus d'un an. Ensuite, après progression de la maladie, le patient a reçu une nouvelle injection de 126 milliards de cellules contenant 95% de cellules Th1 spécifiques de ce même néoantigène, qui ont provoqué une régression de la tumeur pendant au moins 6 mois.



Elahi *et al*, *Frontiers in Immunology*, 2018

Figure 13 : Les différentes générations de CAR

Depuis leur création, plusieurs générations de CAR ont été développées afin d'accroître leur efficacité. La première génération de CAR est composée d'un ScFv, formé par l'association des chaînes lourdes et légères des fragments variables d'une Ig spécifique d'un antigène « entier » exprimé à la membrane des cellules tumorales, respectivement VH (*Variable Heavy*) et VL (*Variable Light*), et d'un domaine CD3ζ permettant la transduction d'un signal 1. La seconde génération de CAR comporte en plus un domaine de costimulation permettant la transduction d'un signal 2. La troisième génération de CAR inclut deux domaines de costimulation pour améliorer le signal 2. Enfin, la quatrième génération de CAR comprend l'ajout d'un domaine intracellulaire NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*), pour que les LT transduits puissent sécréter des cytokines qui vont jouer un rôle dans l'élimination des tumeurs.

2) Les LT modifiés génétiquement

a) Les CAR-T cells

Des LT de haute spécificité peuvent être obtenus en utilisant un transgène codant un récepteur chimérique spécifique d'un antigène tumoral, appelé CAR (Lim and June, 2017). Ils sont composés dans leur partie extra-cellulaire d'un fragment variable à chaîne unique (scFv) dérivé d'un anticorps, leur permettant de reconnaître un antigène tumoral indépendamment des molécules HLA. Le scFv *via* un domaine transmembranaire peut être fusionné à un domaine cytoplasmique du CD3 (CD3ζ), permettant la transduction d'un signal 1 d'activation du LT, ainsi qu'à des domaines cytoplasmiques de molécules de costimulation comme CD28 et/ou 4-1BB (CD137) permettant la transduction d'un signal 2 (Sadelain *et al.*, 2017). Plusieurs générations de CAR ont été développées, afin d'optimiser leur efficacité en clinique (**Figure 13** ; Elahi *et al.*, 2018). En pratique, les LT du patient sont isolés, activés *in vitro* de manière polyclonale (anticorps anti-CD3 +/- anti-CD28) puis modifiés génétiquement par un vecteur codant le CAR avant d'être administrés chez ce même patient (Salmikangas *et al.*, 2018). Cette approche autologue évite ainsi le risque de GVHD (*Graft Versus Host Disease*).

- **Le CAR anti-CD19**

Le plus grand succès de la technologie *CAR-T cells* a été obtenu en clinique avec le CAR anti-CD19. La molécule CD19 est un antigène de surface qui est exprimé uniquement par les LB. Il est exprimé dans la plupart des lymphomes et leucémies B. Il y a maintenant 15 ans, l'efficacité anti-tumorale de ce CAR a été démontrée dans un modèle murin par l'équipe du Pr Michel Sadelain (Brentjens *et al.*, 2003). Dans un modèle murin, une injection unique de LT modifiés avec un CAR anti-CD19 permettait d'éliminer l'ensemble des cellules B malignes. Suite à ce succès, des modifications ont été apportées au CAR anti-CD19 afin de le rendre encore plus fonctionnel *in vivo* (Kochenderfer & Rosenberg, 2013). De ce fait, dans le cadre des leucémies aiguës lymphoblastiques, des résultats spectaculaires ont été obtenus dans des essais cliniques de phase I avec des CAR anti-CD19 de deuxième génération possédant un domaine de costimulation CD28 (Sadelain, 2015).

A l'heure actuelle, deux *CAR-T cells* anti-CD19 ont reçu une approbation par la *FDA* (*Food and Drug Administration*) afin d'être utilisés en thérapeutique. Le premier, appelé tisagenlecleucel (*KYMRIA[®]*), est destiné au traitement des enfants et des jeunes adultes atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë à précurseurs de cellules B, réfractaire à tout traitement ou en rechute. Il est important de noter que ce traitement représente la première approche de thérapie génique approuvée par la *FDA* aux Etats-Unis. Le second, appelé axicabtagene ciloleucel (*YESCARTA[®]*), est quant à lui destiné au traitement de patients adultes atteints d'un lymphome B diffus à grande cellules, réfractaire ou en rechute (Salmikangas *et al.*, 2018). Durant les phases d'évaluation, ces traitements ont démontré une efficacité impressionnante, avec des réponses cliniques rapides et durables. Chez les patients ayant reçu une dose unique de *KYMRIA[®]* ou de *YESCARTA[®]*, le taux de réponse global à court terme était respectivement de 83% et de 72% (Zheng *et al.*, 2018).

Cependant, des limites majeures se présentent quant à l'utilisation de ces *CAR-T cells* en immunothérapie. L'une d'entre elles est la toxicité que peut générer le traitement. En effet, ce type de traitement repose sur l'utilisation d'un grand nombre de LT, de 10^6 à 10^8 cellules $CD3^+/CAR^+$ par kilogramme (Salmikangas *et al.*, 2018). Il a été rapporté que certains patients ont présenté de graves complications après traitement par *CAR-T cells*, pouvant être sévères voire même fatales, liées à une libération massive de cytokines (*CRS*, *Cytokine Release Syndrome*) et/ou à des neurotoxicités (Neelapu *et al.*, 2018). Un autre facteur limitant correspond à la perte d'antigénicité. En effet, les CAR anti-CD19 exercent une pression de sélection sur la tumeur en ne ciblant que l'antigène CD19. La perte de l'antigène visé a notamment été observée chez un enfant atteint de leucémie aiguë lymphoblastique qui a fait une rechute avec des cellules tumorales CD19 négatives (Grupp *et al.*, 2013). Enfin, un autre facteur limitant correspond au coût du traitement. Celui-ci, aujourd'hui compris entre 370 000 et 470 000\$, représente un obstacle supplémentaire à son développement (de Lima Lopes & Nahas, 2018).

- **Défi des *CAR-T cells* : les tumeurs solides**

Avec les grands succès des *CAR-T cells* dans les traitements des leucémies et lymphomes B, un des défis actuels de ce type d'approche thérapeutique est de pouvoir s'appliquer à la lutte contre les tumeurs solides. Des *CAR-T cells* ont été développés pour traiter ce type de tumeur mais leur efficacité est plus nuancée du fait de cibles antigéniques moins bien définies et d'une accessibilité à la tumeur plus limitée (Sadelain *et al.*, 2013). Les *CAR-T cells* rencontrent des barrières physiques qui protègent les niches tumorales. Dans ce contexte, leur optimisation en termes de capacités d'extravasation, de *homing* vers le site tumoral et de persistance au sein d'un microenvironnement immunosuppresseur, fait l'objet de recherches très actives (D'Aloia *et al.*, 2018). Récemment, des cibles intéressantes ont pu être identifiées et plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours (Jackson *et al.*, 2016). Certains présentent même des résultats très encourageants, notamment dans le cadre des neuroblastomes, avec des CAR visant le ganglioside GD2 qui ont induit des réponses complètes chez certains patients (Louis *et al.*, 2011).

- **Rôles des LT CD4⁺ dans les thérapies *CAR-T cells***

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux ont démontré que : (i) la présence de cellules T CD4⁺/CAR⁺ au sein du produit de thérapie cellulaire améliore l'activité cytotoxique médiée par les LT CD8⁺/CAR⁺ (Sommermeier *et al.*, 2016), (ii) les LT CD4⁺/CAR⁺ ont une capacité de survie supérieure aux LT CD8⁺/CAR⁺ et permettent de mieux prévenir les rechutes (Louis *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018), et (iii) les LT CD4⁺/CAR⁺, *via* la sécrétion de cytokines effectrices mais aussi *via* une activité cytotoxique, assurent une réponse anti-tumorale directe (Guedan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Gacerez & Sentman, 2018).

b) Les LT à TCR transgéniques

Il est aussi possible de transduire les LT avec des vecteurs codant des TCR spécifiques d'antigènes de tumeurs. Dans un modèle murin de mélanome, Quezada et collaborateurs ont évalué l'efficacité d'un transfert de cellules LT CD4⁺ murines possédant un TCR transgénique spécifique de l'antigène TRP-1 (*Tyrosinase Related Protein-1*) chez des hôtes irradiés. Ils ont observé une amplification et une différenciation de ces cellules en LT CD4⁺ cytotoxiques capables d'éliminer les cellules de mélanome. Ils ont également constaté que la combinaison de l'ICA avec un traitement anti-CTLA-4 était associée à une augmentation du nombre de LT CD4⁺ effecteurs, une diminution du nombre de LT régulateurs, une augmentation du taux sérique d'IFN- γ et une amélioration de l'activité cytotoxique anti-tumorale des LT CD4⁺ transduits. *In vivo*, la sécrétion d'IFN- γ par les LT CD4⁺ induit une augmentation du niveau d'expression des molécules du CMH-II par les cellules tumorales et conduit à leur reconnaissance par des LT CD4⁺ cytotoxiques (Quezada *et al.*, 2010).

Plus récemment, Shklovskaya et collaborateurs ont mis au point un modèle murin de mélanome permettant une reconnaissance indirecte de la tumeur par des LT CD4⁺ possédant un TCR transgénique spécifique de l'antigène *Moth Cytochrome C* (Shklovskaya *et al.*, 2016). Dans ce modèle, les CPA de l'hôte expriment les molécules du CMH-II contrairement aux cellules tumorales B16. *In vivo*, ces cellules LT CD4⁺ s'activent au contact de telles CPA murines et se polarisent en cellules Th1 qui contrôlent la croissance tumorale sans nécessiter de LB et de LT CD8⁺ mais également sans lyser directement les cellules tumorales. Le contrôle de la tumeur était dû à la capacité de ces cellules Th1 à sécréter des molécules pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α . Ces résultats illustrent bien le fait que les LT CD4⁺ jouent aussi un rôle très important dans la réponse immunitaire contre les tumeurs qui n'expriment pas ou peu les molécules du CMH-II.

Chez l'homme, une étude a également souligné l'intérêt d'utiliser des LT CD4⁺ modifiés avec un TCR transgénique en ICA, dans le cadre des cancers solides (Lu *et al.*, 2017). Des LT CD4⁺ autologues de patients atteints de cancer à un stade avancé ont été transduits avec un TCR transgénique spécifique de MAGE-3. Dix-sept patients ont été traités par une injection de ces LT modifiés à une dose comprise entre 10⁷ et 10¹¹ cellules. Le traitement a permis d'obtenir une réponse complète chez une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus métastatique et une réponse partielle chez certains patients atteints d'un cancer urothélial, d'un cancer de l'œsophage ou d'un ostéosarcome.

OBJECTIFS

A- Optimisation de la présentation des antigènes par des CPAA-II

Les CPAA-II chargées avec un antigène exogène sont capables de présenter l'antigène, mais, néanmoins, elles se révèlent être faiblement efficaces pour « primer » des LT CD4⁺ isolés du sang périphérique de sujets sains. Ceci représente une limite majeure à leur intérêt pré-clinique dans le cadre du développement de nouvelles approches d'ICA. La présentation de xénopeptides par les molécules HLA-DR, qui rentrent en compétition avec l'antigène d'intérêt est l'hypothèse privilégiée pour expliquer ces faibles capacités activatrices. Pour les améliorer, une approche possible est d'induire l'expression endogène et constitutive de l'antigène d'intérêt par les CPAA. Le premier objectif de ma thèse a été de mettre au point de nouvelles lignées de CPAA-II codant un antigène protéique ou peptidique d'intérêt au niveau d'un compartiment cellulaire donné. Nous avons utilisé l'antigène modèle HA, glycoprotéine du virus de la grippe (*influenza virus*), pour lequel des épitopes reconnus par les LT CD4⁺ ont été décrits, dont notamment le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ présenté par les molécules HLA-DR1 (van Bergen *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 2012). Différentes localisations cellulaires en lien avec la voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH-II ont été ciblées dans nos CPAA HLA-DR1⁺ par différentes stratégies d'adressage (**Figure 14**) :

(1) Expression de la protéine HA codée par le transgène à la membrane plasmique : il s'agit de la localisation « naturelle » de la protéine native.

(2) Expression de la protéine HA ou du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ dans le cytoplasme : la séquence peptidique signal de la protéine ainsi que ses domaines transmembranaire et cytoplasmique ont été supprimés. Le peptide d'intérêt n'est précédé d'aucune séquence d'adressage.

(3) Expression du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ dans le RE : la séquence peptidique signal de la protéine CD8α qui cible naturellement ce compartiment (Latouche & Sadelain, 2000), précède la séquence du peptide d'intérêt.

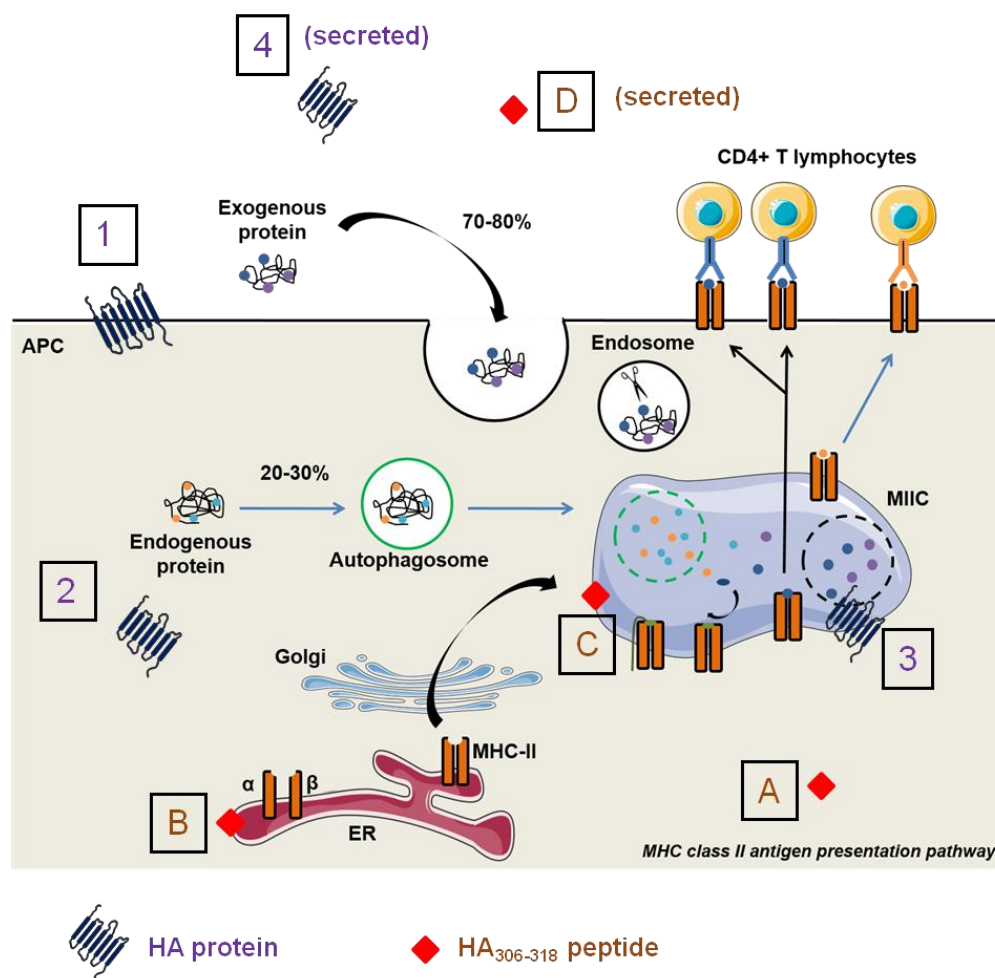


Figure 14 : Ciblage de la voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH-II dans notre modèle de CPAA

Dans les CPAA HLA-DR1⁺ (CPAA^{DR1}), la protéine HA été exprimée à la membrane plasmique (1), dans le cytoplasme (2), dans les endosomes (3) ou de façon à être sécrétée dans le milieu extracellulaire (4). Dans les CPAA^{DR1}, le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈, a été exprimé dans le cytoplasme (A), dans le RE (B), dans les endosomes (C) ou de façon à être sécrété dans le milieu extracellulaire (D).

(4) Expression de la protéine HA ou du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ au niveau des endosomes : la protéine, dont la séquence peptidique signal et les domaines transmembranaire et cytoplasmique ont été supprimés, est couplée à la séquence peptidique signal de la protéine gp75 (*glycoprotein 75*) qui cible les endosomes (Ahangarani *et al.*, 2009). Le peptide d'intérêt est couplé à cette même séquence peptidique signal pour atteindre ce compartiment cellulaire.

(5) Expression de la protéine HA ou du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ dans le milieu extracellulaire : la protéine, dont la séquence peptidique signal et les domaines transmembranaire et cytoplasmique ont été supprimés, est couplée à une séquence peptidique signal de sécrétion issue de la vitellogénine (Tan *et al.*, 2002). Le peptide d'intérêt est couplé à cette même séquence peptidique signal.

En collaboration avec l'unité Inserm U1237, la capacité de ces nouvelles CPAA à présenter l'antigène, comparée à celle de CPAA ou de cellules B-EBV chargées avec l'antigène exogène, a été évaluée en utilisant un clone T CD4⁺ spécifique de l'épitope HA₃₀₆₋₃₁₈. *In fine*, cette étude permettra une meilleure compréhension des mécanismes de présentation des antigènes par les molécules HLA-DR dans nos CPAA.

B- Evaluation des capacités des nouvelles CPAA-II à générer des effecteurs T CD4⁺

Nous avons choisi les lignées de CPAA exprimant l'antigène de façon endogène les plus aptes à présenter l'antigène, et évalué leur capacité à activer des LT CD4⁺ de sujets sains en culture primaire, en comparaison avec des CPA autologues. La capacité de ces CPAA à réactiver des LT mémoires obtenus après une stimulation primaire par des CPA autologues a également été évaluée. Le phénotype et la fonction de ces LT mémoires ont aussi été étudiés.

RESULTATS

Article : ciblage de la voie de présentation des antigènes par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II dans des cellules présentatrices d'antigène artificielles pour activer efficacement des lymphocytes T CD4⁺ humains spécifiques

Les résultats de cette étude font actuellement l'objet d'un dépôt de brevet auprès d'Inserm Transfert et ils seront par la suite soumis dans le journal scientifique international « Cellular and Molecular Immunology ». Un résumé de ce travail est présenté ci-dessous.

L'utilisation de LT CD4⁺ humains spécifiques en ICA est une approche très prometteuse, notamment dans le cadre des cancers. Cependant, la disponibilité de CPA autologues permettant d'obtenir rapidement un nombre suffisant de LT spécifiques fonctionnels reste un défi majeur. Dans ce contexte, nous avons optimisé la présentation de l'antigène par nos CPAA de classe II (CPAA-II), dérivées de fibroblastes murins NIH/3T3, exprimant les molécules essentielles pour activer des LT CD4⁺ humains, afin d'améliorer la réponse T CD4⁺ que ces cellules peuvent générer. Pour ce faire, l'antigène d'intérêt (HA) a été adressé sous forme de peptide (HA₃₀₆₋₃₁₈) ou de protéine au niveau de différents compartiments cellulaires impliqués dans la présentation de l'antigène par les molécules du CMH de classe II.

Nous avons mis en évidence que les CPAA-II exprimant le peptide dans le RE et celles exprimant la protéine à la membrane plasmique étaient les plus efficaces pour présenter l'antigène. Néanmoins, tout comme les CPAA-II chargées avec le peptide HA, ces deux lignées de CPAA-II exprimant l'antigène de façon endogène restaient moins efficaces que des CPA autologues chargées avec le peptide HA pour amplifier des LT CD4⁺ spécifiques, issus du sang périphérique, en stimulation primaire *in vitro*. En revanche, en seconde stimulation *in vitro*, nous avons montré, que les CPAA-II exprimant le peptide dans le RE étaient significativement plus efficaces que les autres CPA (CPAA-II exprimant la protéine membranaire, CPAA-II ou CPA autologues chargées avec le peptide HA) pour amplifier des LT CD4⁺ spécifiques mémoires fonctionnels.

A l'issue du protocole d'amplification *in vitro*, les effecteurs qui avaient été restimulés par ces CPAA étaient des cellules Th1 productrices d'IFN- γ et de TNF- α , et exprimant la granzyme B mais pas la perforine. Ils présentaient un phénotype effecteur mémoire (CD45RO⁺, CD62L⁻ et CCR7⁻) ou transitionnel mémoire (CD45RO⁺, CD62L⁺, CCR7⁻).

Ici, à partir d'un modèle de CPAA-II standardisées et prêtes à l'emploi, nous avons développé un protocole d'amplification *in vitro* de LT CD4⁺ humains spécifiques et fonctionnels, partageant des propriétés communes avec les effecteurs anti-tumoraux utilisés en ICA. Ce protocole nous a permis de générer rapidement et de façon reproductible un nombre de cellules compatible avec une utilisation thérapeutique.

ARTICLE (ORIGINAL MANUSCRIPT)

Targeting of the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway in artificial antigen presenting cells to activate human specific CD4+ T cells

Alexandre Couture¹, Anthony Garnier², Camille Le-Fèvre¹, Gaëtan Riou³, Estelle Dupel¹, Hafid Kora¹, Amélie Dénier², Pierre Trémolières², Jérôme Leprince⁴, Benjamin Lefranc⁴, Fabian Docagne², Brigitte Le-Mauff^{2,5}, Olivier Toutirais^{*,2,5,6} and Jean-Baptiste Latouche^{*,1,7}

¹Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245, Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), F76000, Rouen, France;

²Inserm U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen University Hospital, F14000, Caen, France;

³Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular diseases and regenerative THERapies (PANTHER), Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), F76000, Rouen, France;

⁴Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), F76000, Rouen, France;

⁵Department of Immunology and Immunopathology, Caen University Hospital, F14000, Caen, France;

⁶French Blood Service (Etablissement Français du Sang, EFS), F14000, Caen, France;

⁷Department of Genetics, Rouen University Hospital, F76000, Rouen, France

* These two authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Jean-Baptiste Latouche, Inserm U1245, IRIB, Faculty of Medicine, 22 boulevard Gambetta, 76183 Rouen CEDEX 1, France; phone: +33 2 32 88 03 97; Fax: +33 2 35 14 82 37; mail: jean-baptiste.latouche@chu-rouen.fr

ABSTRACT

CD4 T cell help is essential to promote robust cytotoxic T cell responses and could be harnessed to improve outcomes of cancer immunotherapy. To induce CD4⁺ T cell responses, we have previously developed artificial antigen presenting cells (AAPCs) that derived from a mouse fibroblast cell line genetically modified to express a single human leukocyte antigen class II molecule (HLA-DR), the human CD80 costimulation as well as CD54 and CD58 adhesion molecules. In this study, the model was optimized with novel AAPCs HLA-DR1⁺ (AAPC^{DR1}) that constitutively express an antigen (Ag) in peptide or protein forms in different compartments involved in the major histocompatibility complex class II Ag presentation pathway. We found that AAPC^{DR1} expressing the Ag peptide in the endoplasmic reticulum (ER) or protein at the plasma membrane were more potent than Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells to present epitopes to specific CD4⁺ T-cells. In addition, these two Ag-encoding AAPC cell lines prime specific CD4⁺ T cells but at lower level than autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) used as CPA. Interestingly, AAPC^{DR1} targeting the Ag peptide in the ER was more efficient than peptide-pulsed AAPC^{DR1} or autologous APC to amplify memory Ag-specific CD4⁺ T cells that harbor a Th1 profile and express granzyme B. So, our AAPC system is a reliable and standardized tool to generate a high number of Ag-specific CD4⁺ with effector functions useful for a cancer adoptive immunotherapy.

Keywords: CD4⁺ T lymphocytes; Ag presentation; artificial antigen presenting cells; immunotherapy

INTRODUCTION

Adoptive cell immunotherapy (ACI) strategies, using human functional Ag-specific T lymphocytes (TLs), represent an emerging therapeutic approach to treat cancer but also chronic viral infections. Even if cytotoxic CD8⁺ TLs (CTLs) are the main effectors of the anti-tumor immune response, CD4⁺ helper T cells (Th) are crucial to support indirectly the CD8⁺ responses.¹ CD40 signaling on dendritic cells (DCs) *via* an interaction with activated Th cells expressing CD40-L increased Ag presentation and costimulatory capacity of DCs and promote efficient CTL priming.² IL-2 secretion by Th cells and induction of IL-15 production by DCs is critical for memory CTL responses.^{3,4} Recently, it was shown that CD4⁺ T cells up-regulated CD70 on DCs which in turn interact with CD27 on CTLs delivering a help program that amplify CTL responses and down-regulated exhaustion molecules such as Programmed Death-1 (PD-1).⁵ In addition, CD4⁺ TLs can act directly against tumor cells without contribution of CD8⁺ T cells. CD4⁺ T cells including Th1, Th9 and Th17 can act directly against tumor by secreting effector cytokines and/or displaying cytotoxic activity against major histocompatibility complex class II (MHC-II) positive tumors.⁶⁻⁸

The use of CD4⁺ TLs in preliminary clinical trials of ACI has shown promising results. Infusion of *in vitro* expanded autologous CD4⁺ T-cell clones specific for the New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1 (NY-ESO-1) Ag led to durable remission in a patient with metastatic melanoma.⁹ Moreover, MHC-II-restricted neoantigens were found in many cancers and represent interesting targets for clinical applications.¹⁰⁻¹² A disease stabilization was observed in a patient with metastatic cholangiosarcoma after ACI with Th1 tumor infiltrating lymphocytes (TILs) specific for a neoantigen deriving from the *erbb2* interacting protein (ERBB2IP).¹³

However, the main limiting step for an effective ACI is the generation of a sufficient number of Ag-specific TLs by antigen presenting cells (APCs). *In vitro*, preparation of such APCs, like DCs, is time consuming and can raises concerns about their quantity, maintenance of their phenotype and functionality. To bypass these difficulties, our group has developed artificial antigen presenting cells (AAPCs) derived from mouse fibroblast NIH/3T3 and expressing a single human leukocyte antigen class II (HLA-II) molecule (HLA-DR1), the co-stimulatory molecule CD80 (B7.1) and the two adhesion molecules CD54 (intercellular

adhesion molecule-1, ICAM-1) and CD58 (lymphocyte function-associated antigen-3, LFA-3).¹⁴ We have shown that these AAPCs (named AAPC^{DR}) have strong abilities to present exogenous peptide or epitope from whole Ag that have been uptaken. AAPC^{DR} exhibit lower ability to prime specific CD4⁺ T cells than autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), but had better ability to re-stimulate functional memory Ag-specific Th1 cells than autologous APCs.

To optimize and standardize AAPC^{DR} model, induction of endogenous and constitutive expression of the Ag could be an interesting approach. Nevertheless, the cell compartments to target for Ag expression should be accurately investigated. In the classical MHC-II Ag presentation pathway, MHC-II molecules α and β chains are assembled within the endoplasmic reticulum (ER) and associated with the invariant chain (Ii). This heterotrimer migrate, *via* the Golgi apparatus, to the MHC-II compartment (MIIC). In this specialized endolysosomal compartment, Ii is sequentially degraded by proteases and only the class II invariant chain peptide (CLIP) remains in the MHC-II molecule groove. CLIP peptides are then replaced by peptides of higher affinity due to the HLA-DM chaperone protein. These peptides are mainly originated from exogenous Ags that are endocytosed by APCs and degraded by proteases but could arise from endogenous peptide from autophagosomes. Then, peptide/MHC-II complexes will migrate to the APC plasma membrane.¹⁵⁻¹⁷

In this study, we have generated novel Ag-encoding AAPCs HLA-DR1⁺ (AAPC^{DR1}) that express Ag in a peptide or in a protein form in different specific cellular compartment involved in the MHC-II Ag presentation pathway. Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines expressing the peptide in the ER or the protein at the cell membrane display better Ag presentation capacity than AAPCs or professional APCs loaded with exogenous peptide. These two Ag-encoding AAPCs prime CD4⁺ effector T cells at similar level than AAPCs loaded with exogenous peptide but were less efficient than autologous APCs. Importantly, the AAPC^{DR1} cell line which encodes the peptide Ag within the ER is more effective than Ag-pulsed AAPC^{DR1} and autologous APCs to amplify functional specific CD4⁺ TLs. This AAPC model is a reliable tool to generate CD4⁺ effector T cells for ACI strategies.

MATERIAL AND METHODS

Healthy donors and CD4⁺ TLs purification

Peripheral blood from HLA-DRB1*01:01⁺ (HLA-DR1) healthy donors of the French Blood Service (EFS Hauts de France, Caen, France) was collected in heparin tubes, after informed consent was obtained. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation on lymphocyte separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France). CD4⁺ TLs were isolated from PBMCs by negative magnetic purification, using the Dynabead Untouched Human CD4 T Cells Kit (ThermoFischer Scientific, Illkirch, France), according to the manufacturer's protocol.

Design of strategies for the targeting of Ag in MHC-II pathway compartments and construction of AAPC^{DR1} cell lines

The viral Ag of hemagglutinin (HA, Influenza A H3N2, strain A/Aichi/2/1968) used in this study is a transmembrane protein of 566 amino acids. It is consisted of a signal peptide (HA₁₋₁₆), an extracellular domain (HA₁₇₋₅₃₀) which contains the epitope HA₃₀₆₋₃₁₈ restricted to the HLA-DR1 context, a transmembrane domain (HA₅₃₁₋₅₅₁) and by a cytoplasmic domain (HA₅₅₂₋₅₆₆). Nine novels Ag-encoding AAPC^{DR1} were constructed. The first one was transduced with a vector encoding the whole HA protein (Supplementary Material and Methods Figure 1a). For the others HA protein-encoding AAPC^{DR1}, the signal peptide, transmembrane and cytoplasmic domains of the protein were deleted to ameliorate Ag trafficking. In this condition, without signal peptide, the HA protein can be express in the cytoplasm. The extracellular domain of HA protein was coupled to the signal peptide of the glycoprotein 75 (gp75) *via* a linker to target endosomes, or to the secretion signal peptide of the vitellogenin (Vtg) in order to induce secretion of the protein.¹⁸⁻²⁰ Using the same approaches, the HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide was used to target the cytoplasm, endosomes and the extracellular media (Supplementary Material and Methods Figure 1b). To target the ER, HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide was coupled to the CD8 α signal peptide, as we previously described.²¹ All Ag-encoding complementary DNAs (cDNAs) were synthesized and purchased from GeneArt[®] (ThermoFischer Scientific). These cDNAs were optimized for Ag translation in *mus musculus* organism to favor their expression in NIH/3T3 based AAPCs. Nucleotide sequences of the different cDNAs are shown in Supplementary Material and Methods Figure

2. The construction of NIH/3T3-derived AAPC^{DR1} was previously described.¹⁴ The cDNAs encoding addressed Ags were subcloned into dicistronic gammaretrovirus-derived SFG vectors expressing puromycin-N-acetyltransferase. All constructs were verified by Sanger DNA sequencing. H29/293 GPG packaging cells were transfected with each vector, using the calcium chloride precipitation method.²² AAPC^{DR1} were genetically modified by sequential infections with cell-free gammaretroviral supernatants corresponding to the Ag of interest (Ag-encoding AAPC^{DR1}), in the presence of 8µg/ml of polybrene (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 16 h. Cells transduced by dicistronic vector were selected with 5µg/ml of puromycin (Sigma-Aldrich). AAPC^{DR1} cell lines were cultured in DMEM (ThermoFischer Scientific) supplemented with 10% of decomplexed AB human serum (Sigma-Aldrich).

RNA extraction from AAPC^{DR1} and mouse splenocytes followed by two-step RT-PCRs

Mouse splenocytes were kindly provided by G Riou (Inserm U1234, University of Rouen Normandy, Rouen, France). RNAs of AAPC^{DR1} and mouse splenocytes were extracted from 5.10⁶ cells using the NucleoSpin RNA isolation kit (Macherey-Nagel, Easton, PA, USA) according to the manufacturer's protocol. cDNAs were generated from 200 ng of total RNA using oligo (dT) and random sequence primers (Random Hexamer) and VersoTM cDNA kit (Thermo Fischer Scientific), according to the manufacturer's instructions. cDNAs were PCR-amplified obtained using primers (Eurogentec SA, Liège, Belgium) described in Supplementary Material and Methods Table 1.

Peptide Ags

Two peptides were used in this study. The HA₃₀₆PKYVKQNTLKLAT₃₁₈ peptide of H3N2 *influenza virus* restricted to the HLA-DR1 molecule presentation was used as the peptide of interest. The Myelin Basic Protein, MBP₈₄DENPVVHFFKNIVTPRTPP₁₀₂ peptide was used as a control peptide. These peptides were kindly provided by Dr J Leprince and B Lefranc (Inserm U1239, University of Rouen Normandy, Rouen, France).

T-cell clone and B-EBV^{DR1} cell lines

CD4⁺ T-cell clone Flu-2, specific for HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide, was kindly provided by Pr A Godkin (Institute of Infection and Immunity, Cardiff, UK).²³ The homozygous HLA-DR1⁺ B-EBV cell line was a kind gift from Dr H Vié (Inserm UMR 1232, Nantes, France). Culture of the T-cell clone was performed in 96-well U bottom plates in RPMI (ThermoFischer Scientific), supplemented with 1% of Fetal Calf Serum (FCS, ThermoFischer Scientific), 2 mM of glutamine (ThermoFischer Scientific), 50 IU/ml of penicillin (ThermoFischer Scientific) and 50 µg/ml of streptomycin (ThermoFischer Scientific). Culture of HLA-DR1⁺ B-EBV cell line was performed in RPMI supplemented with 10% of FCS (Fetal Calf Serum, ThermoFischer Scientific).

Cell membrane staining

AAPC^{DR1} were stained for 20–30 min at 4°C in phosphate-buffered saline/bovine serum albumin/ethylenediamine tetraacetic acid (PBS/BSA/EDTA) buffer with the following antibodies: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse I-A/I-E (BioLegend, London, UK), FITC-conjugated anti-human CD58 (BD Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and FITC-conjugated anti-human CD54, CD80 and HLA-DR (all from ThermoFischer Scientific). In the same conditions, TLs were stained with the following antibodies: FITC-conjugated anti-human CD4, phycoerythrin (PE)/Cyanine 7 (Cy7)-conjugated anti-human CD45RA, peridinin chlorophyll protein complex (PerCP)/Cyanine 5.5 (Cy5.5)-conjugated anti-human CD45RO, allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human CCR7, APC/Cy7-conjugated anti-human CD62L, PerCP/Cy5.5-conjugated anti-human PD-1 (all from ThermoFischer Scientific), APC/Cy7-conjugated anti-human CD3, brilliant violet (BV)786-conjugated anti-human CD8, APC-conjugated anti-human CTLA-4, BV711-conjugated anti-human TIM-3 (all from Sony Biotechnology, Weybridge, UK) and BV421-conjugated anti-human TIGIT (BioLegend). CTLA-4 expression was also detected by intracellular staining as described below. Frequency of HA-specific CD4⁺ TLs was assessed by tetramer staining for 30 min at room temperature with PE-conjugated HLADRB1*01:01-HA (DR1-HA, ProImmune, Oxford, UK) or control HLA-DRB1*01:01-CLIP tetramers (DR1-CLIP, a kind gift of the NIH Tetramer Core Facility, Atlanta, GA, USA). Cells were analyzed using BD LSRFortessa cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Intracellular staining

For intracellular cytokine staining, TLs were treated using the Intraprep Permeabilization Reagent kit (Beckman Coulter, Villepinte, France) according to the manufacturer's protocol. TLs were stained with the following antibodies: APC-conjugated anti-human IFN- γ , PE-conjugated anti-human TNF- α , PE-conjugated anti-human granzyme B (all from ThermoFischer Scientific) and APC-conjugated anti-human perforin (Sony Biotechnology).

Stimulation of the T-cell clone

For evaluation of Ag presentation, CD4⁺ T-cell clone (10^5 per well) was cultured for 6 h with AAPC^{DR1} or B-EBV^{DR1} cell lines (10^5 per well for an APC : TL ratio of 1 : 1) previously loaded for 1 hour with 10 μ g/ml of HA or MBP control peptide or cultured with Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines (10^5 per well for an APC : TL ratio of 1 : 1). Brefeldin A at 10 μ g/ml (Sigma-Aldrich) was added for the last 5 h of incubation before intracellular cytokine staining.

Stimulation of purified CD4⁺ TLs by AAPC^{DR1} or PBMCs

For primary stimulation experiments, irradiated (25 Gy) Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines or irradiated AAPC^{DR1} loaded for 1 hour with 10 μ g/ml of HA or control peptides were plated (1.5×10^5 per well) 4 hours before incubation with purified CD4⁺ TLs from healthy subjects (1×10^6 per well) for 14 days. Alternatively, PBMCs (2×10^6 per well) were incubated with 10 μ g/ml of HA or control peptides for the same duration. For re-stimulation experiments, effector TLs (1×10^6 per well) generated by primary culture of PBMCs pulsed with HA peptide were incubated with either irradiated (25 Gy) adherent Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines (1.5×10^5 per well), or either AAPC^{DR1} (1.5×10^5 per well) or autologous PBMCs (2×10^6 per well) loaded with 10 μ g/ml of HA or control peptides for 7 days. Cultures were performed in 24-well plates with AIM-V CTS medium (ThermoFischer Scientific) supplemented with 2 mM of glutamine (ThermoFischer Scientific) and 5% of decompemented human AB serum (Sigma-Aldrich). On day 4, and then every other day, 20 IU/ml of interleukin-2 (R&D Systems, Lille, France) was added (Supplementary Material and Methods Figure 3).

Statistics

Prism software (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) was used to perform repeated measures of one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's post test.

RESULTS

Ag-encoding AAPC^{DR1} express molecules required to activate human CD4⁺ TLs but not mouse molecules involved in MHC-II Ag presentation pathway

AAPC^{DR1} were constructed by gammaretroviral transduction of mouse fibroblasts NIH/3T3 with vectors encoding HLA-DR α , HLA-DR β 1*01:01 (HLA-DR1), CD80 co-stimulatory and CD54 and CD58 adhesion molecules. To obtain Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines, AAPC^{DR1} were additionally transduced with different constructs expressing the HA viral Ag, in the form of a protein or a peptide, and addressing the Ag to a particular cellular compartment (Supplementary Material and Methods Figure 1). After transduction, AAPC^{DR1} and the eight Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines presented high expression and comparable levels of HLA-DR, CD80, CD54 and CD58 molecules (Figure 1a). NIH/3T3 or AAPC^{DR1} do not express the classical mouse MHC-II molecules (I-A and I-E) at their surface (Figure 1b) neither the mouse invariant chain nor the “non-classical” mouse MHC-II molecules (H-2M and H-2O), which are all involved in the mouse MHC-II Ag presentation pathway (Supplementary Figure 1). Taken together, these data indicates that these AAPCs are well equipped to activate human but not mouse CD4⁺ T cells.

Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines efficiently process proteins and present peptide Ags

To assess the ability of the novels Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines to present Ags, we used a CD4⁺ T-cell clone that recognizes the HA₃₀₆₋₃₁₈ epitope, restricted to the HLA-DR1 context. Several ratios of AAPCs to T-cell clone were used in order to compare their stimulatory ability. As previously described, AAPC^{DR1} loaded with HA peptide were very efficient to activate the specific T-cell clone, at a higher level than B-EBV^{DR1} cells (Figure 2a). Among the eight HA Ag-encoding AAPCs, those expressing HA peptide in the ER and those expressing HA protein at the plasma membrane are the most powerful stimulatory cells (Figure 2b and c). These both AAPCs have similar Ag presentation ability than AAPC^{DR1} loaded with HA peptide. In contrast, AAPC^{DR1} expressing HA Ag in the cytoplasm have the lowest stimulatory capacities.

Ag-encoding AAPC^{DR1} prime human CD4⁺ T cells at lower level than autologous APCs

Next, we selected AAPC^{DR1} expressing HA peptide in the ER and HA protein at the cell surface, and evaluated their ability to prime human CD4⁺ T cell response. The two HA Ag-encoding AAPC^{DR1} were able to generate HA-specific CD4⁺ T cell with the same efficacy than AAPC^{DR1} pulsed with HA peptide. HA-tetramer staining and IFN- γ production after reactivation with B-EBV^{DR1} cells show about 1,5 to 3% specific CD4⁺ T cells (Figure 3a et b). However, autologous PBMCs pulsed with HA peptide were more effective to prime CD4⁺ T cells, resulting in 15% of CD4⁺/HA-tetramer⁺ cells but also in 10,9% of CD4⁺/IFN- γ ⁺ cells after B-EBV^{DR1} reactivation.

Ag-encoding AAPC^{DR1} expressing HA peptide in the ER are more effective to reactivate memory specific CD4⁺ T cell than autologous APCs

Effectors generated in primary culture by stimulating CD4⁺ T cells with PBMCs pulsed with HA peptide were re-stimulated by AAPCs or autologous APCs. AAPC^{DR1} pulsed with HA peptide and the two HA Ag-encoding AAPC^{DR1} generated superior frequencies of memory specific CD4⁺ T cells than autologous PBMCs as assessed by tetramer or IFN- γ staining (Figure 4a, b, and c). In term of absolute number, AAPC^{DR1} encoding HA peptide in the ER is significantly the more effective stimulating cells for amplifying memory T cells (Figure 4b and c). After re-stimulation by autologous PBMCs or by AAPCs, HA-specific CD4⁺ TLs were IFN- γ and TNF- α producing Th1 cells with a similar naïf/memory phenotype including a majority of effector memory T cells (T_{EM}; CD45RO⁺, CD62L⁻, CCR7⁻) (Figure 4a and c, Supplementary Figure 2b). The other cells were transitional memory (T_{TM}; CD45RO⁺, CD62L⁺, CCR7⁻). A contingent of CD4⁺ T cells produce granzyme B but not perforin after reactivation with the HA peptide, suggesting they are cytotoxic T cells (Supplementary Figure 3b). Re-stimulation by autologous APCs or AAPCs increased similarly expression of immuno-regulation molecules as T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT), T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3), cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) and PD-1 (Supplementary Figure 2a).

DISCUSSION

In this study, we have developed novels AAPCs that endogenously express Ag in several compartments involved in MHC II pathway. We identified AAPC^{DR1} encoding HA peptide in the ER and AAPC^{DR1} encoding HA membrane protein as the most effective cells to present Ag. Previously, with AAPCs expressing HLA-I molecules we have demonstrated that addressing a peptide Ag in the ER using the signal sequence of the CD8 α molecule is a very reliable strategy to trigger CTL responses.²¹ Similarly, the high efficiency of peptide encoding AAPC^{DR1} in ER may explain by an optimal loading of HA peptide into nascent MHC-II molecule in absence of the chaperone protein Ii that blocks peptide cleft. The potent Ag presentation ability of AAPC^{DR1} expressing HA protein at the cell membrane may result of the recycling of HA proteins and HLA-DR1 molecules. Indeed, it has been already demonstrated in professional APCs but also in fibroblasts that some HA epitopes can be generated into early endosomes which contain MHC-II recycled molecules and unfolding HA protein that have underwent mild proteolysis, independently of Ii and HLA-DM present in the MIIC.^{24–26} Conversely, the weak Ag presentation ability of protein-encoding AAPCs targeting endosome could be linked to a high proteolysis activity that does not lead to the generation of the appropriate HA epitope. In accordance with this hypothesis, Kim et al described that the HA_{306–318} epitope was highly sensitive to the digestion by cathepsins.²⁷ AAPCs expressing peptide or protein in extracellular media were less efficient to present Ag than AAPCs targeting ER or the plasma membrane likely because of a low level of endocytosis. AAPCs expressing HA protein or peptide in the cytosol are the weakest stimulating cells. This may explain by a inappropriate proteasome cleavage of HA protein and/or a weak TAP (Transporter associated with Antigen Processing) transport of the HA peptide in ER due to their sequence and length that do not fit common features of HLA-I ligands.^{28,29}

Although AAPCs expressing HA peptide in ER or protein in membrane as well as AAPCs loaded with HA peptide have strong Ag presentation capacity, they activate effector CD4⁺ T cells after primary stimulation but at lower level than autologous APCs. It is likely that endogenous expression of HA Ag is not sufficient to hamper presentation of xenopeptide competitors and so to limit non-specific CD4⁺ T cell responses. To prevent the access of xenopeptides in the ER, a promising approach is to induce expression of the TAP inhibitors such as UL49.5 and US6 viral proteins of AAPC^{DR1} by gene transfer.³⁰ The xenopeptides presented by HLA-DR1 molecules can also arise from autophagy mechanisms.^{31,32} Autophagy

represents an important source of endogenous peptides presented on MHC-II molecules.³³ Blockade of this mechanism using specific inhibitors such as bafilomycin A1, could decrease the binding of xenopeptides on MHC-II molecules.³⁴ Moreover, to increase priming ability of AAPC^{DR1}, it will be interesting to generate an AAPC^{DR1} cell line expressing both HA peptide in the ER and HA protein at the cell surface.

Interestingly, targeting approach of HA peptide in ER is an efficient strategy to obtain a higher number of Ag-specific memory CD4⁺ T cells than with AAPCs or autologous APCs loaded with HA peptide. Effector T cells harbor a strong Th1 profil with high production of IFN- γ and TNF- α , that is a relevant property for anti-tumor immunotherapy.³⁵ In addition, we identified a subset of CD4⁺ T cells that express granzyme B but not perforin. This expression was already reported as a Th1 memory cells characteristic.³⁶ Further studies are needed to evaluate the function of this subset. However, whatever the stimulating cells, expanded specific CD4⁺ T cells express immuno-regulation molecules as TIGIT, TIM-3, PD-1 and CTLA-4 that could limit their functionality *in vivo*. It was shown that CTL based ACI efficiency was improved by immune checkpoints blockades combination.^{37,38} It likely that the same therapeutic approach is required for ACI replying in part on effector CD4⁺ T cells. AAPCs could also be modified to express appropriate costimulation signals that improve CD4⁺ TLs survival and functionality. For this purpose, CD70 and 4-1BBL molecules are two promising candidates. Indeed, the CD27/CD70 costimulatory signaling pathway has been reported to promotes Th1 polarization but also CD4⁺ TLs survival.³⁹ On the other hand, interaction between 4-1BB and 4-1BBL molecules favors proliferation and effector functions like cytolytic activity of activated CD4⁺ TLs.⁴⁰⁻⁴²

In this study we confirmed that AAPCs is a suitable tool to generate an absolute number of functional specific CD4⁺ TLs compatible for ACI protocols.¹⁴ We also show that HA protein-encoding AAPC^{DR1} are efficient to process whole Ag and generate peptide epitopes. This property could be exploited to identify new T CD4⁺ epitopes from therapeutic interest Ags by HLA-II/peptide complexes immunoprecipitation of AAPC^{DR1}, coupled to mass spectrometry analysis.⁴³ In parallel, AAPC^{DR1} expressing endogenous or exogenous Ag could be a reliable tool to monitor human T CD4⁺ responses *in vitro*.⁴⁴ In conclusion, based on Ag-encoding AAPC^{DR1}, we have developed an *in vitro* protocol enabling a rapid and robust amplification of functional memory Th1 cells for future ACI applications.

Conflict of interest: the authors have no conflict of interest to declare.

Funding: this work was supported by grants from la Ligue Nationale Contre le Cancer-Région Normandie, la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, the European Regional Development Fund (ERDF) from European Union and Normandie Regional Council.

REFERENCES

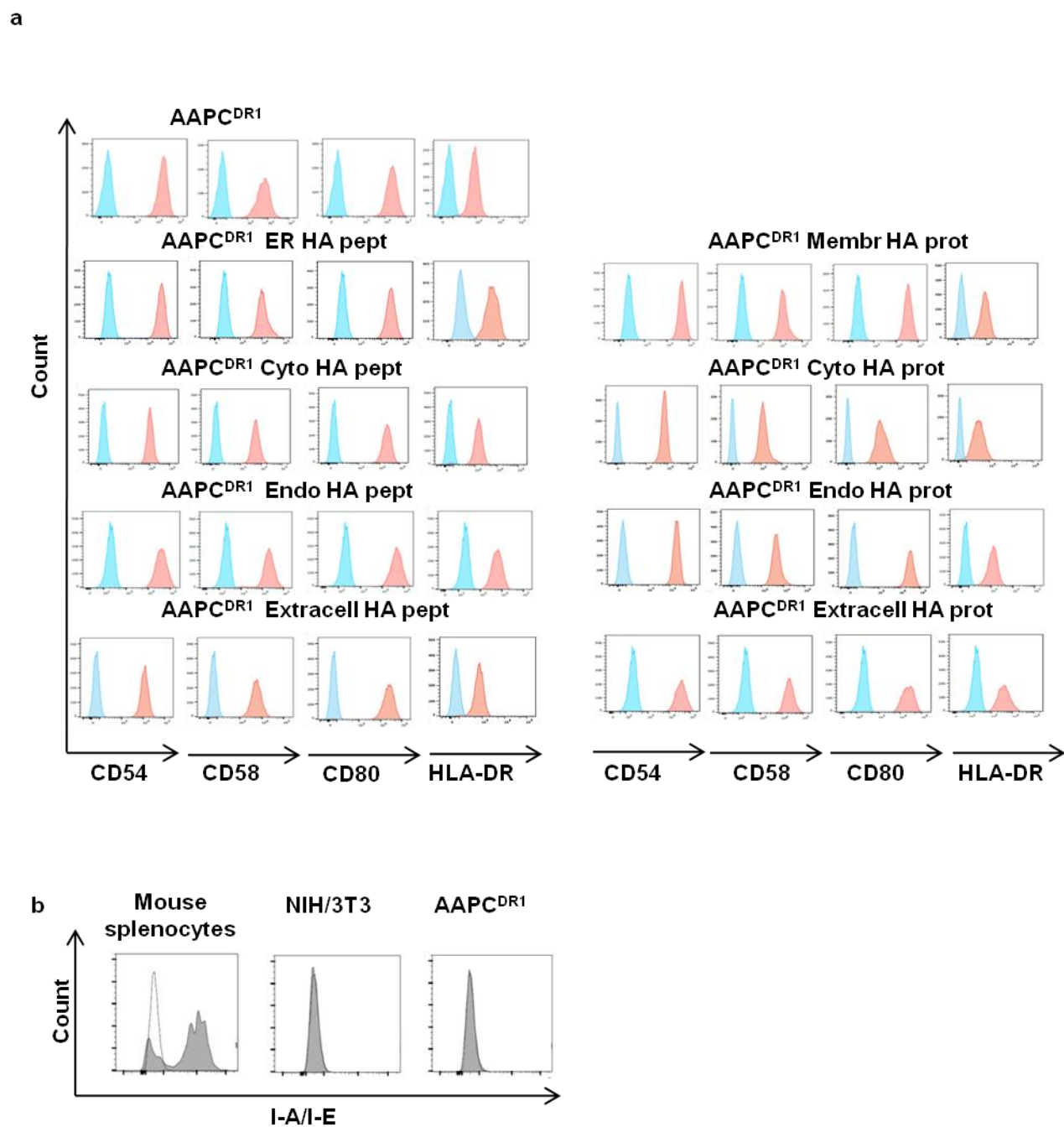
1. Borst J, Ahrends T, Bąbała N, Melief CJM, Kastenmüller W. CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2018; **18**: 635-647.
2. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaeck SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol* 2016; **16**: 102-11.
3. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* 2006; **441**: 890-3.
4. Oh S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15 as a mediator of CD4⁺ help for CD8⁺ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 5201-6.
5. Ahrends T, Spanjaard A, Pilzecker B, Bąbała N, Bovens A, Xiao Y, et al. CD4⁺ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* 2017; **47**: 848-861.e5.
6. Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, et al. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity* 2011; **35**: 972-85.
7. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 2010; **207**:637-50.
8. Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med* 2012; **18**: 1248-53.
9. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4⁺ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 2008; **358**: 2698-703.

10. Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, Verdegaal EME, Schotte R, Calis JJA, et al. High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4⁺ T cells in human melanoma. *Nat Med* 2015; **21**: 81-5.
11. Mennonna D, Maccalli C, Romano MC, Garavaglia C, Capocefalo F, Bordoni R, et al. T cell neoepitope discovery in colorectal cancer by high throughput profiling of somatic mutations in expressed genes. *Gut* 2017; **66**: 454-63.
12. Sun Z, Chen F, Meng F, Wei J, Liu B. MHC class II restricted neoantigen: A promising target in tumor immunotherapy. *Cancer Lett* 2017; **392**: 17-25.
13. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu Y-C, Dudley ME, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* 2014; **344**: 641-5.
14. Garnier A, Hamieh M, Drouet A, Leprince J, Vivien D, Frébourg T, et al. Artificial antigen-presenting cells expressing HLA class II molecules as an effective tool for amplifying human specific memory CD4(+) T cells. *Immunol Cell Biol* 2016; **94**: 662-72.
15. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 823-36.
16. ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5**: a016873.
17. Sadegh-Nasseri S. A step-by-step overview of the dynamic process of epitope selection by major histocompatibility complex class II for presentation to helper T cells. *F1000Research* 2016; **5**.
18. Ahangarani RR, Janssens W, VanderElst L, Carlier V, VandenDriessche T, Chuah M, et al. In vivo induction of type 1-like regulatory T cells using genetically modified B cells confers long-term IL-10-dependent antigen-specific unresponsiveness. *J Immunol* 2009; **183**: 8232-43.

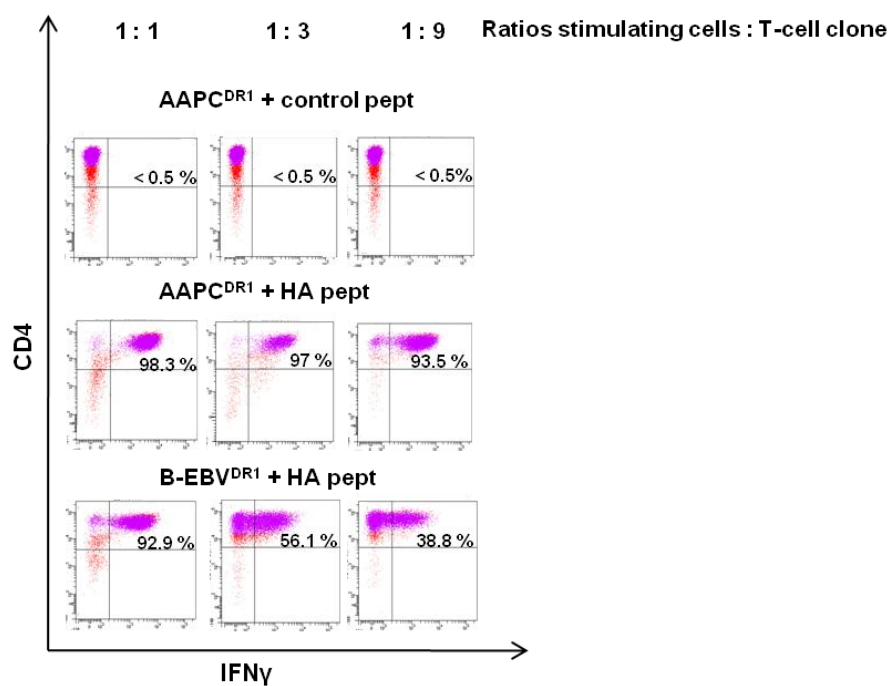
19. Wang S, Bartido S, Yang G, Qin J, Moroi Y, Panageas KS, *et al.* A role for a melanosome transport signal in accessing the MHC class II presentation pathway and in eliciting CD4⁺ T cell responses. *J Immunol* 1999; **163**: 5820-6.
20. Tan NS, Ho B, Ding JL. Engineering a novel secretion signal for cross-host recombinant protein expression. *Protein Eng* 2002; **15**: 337-45.
21. Latouche JB, Sadelain M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat Biotechnol* 2000; **18**: 405-9.
22. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 11400-6.
23. Cole DK, Gallagher K, Lemercier B, Holland CJ, Junaid S, Hindley JP, *et al.* Modification of the carboxy-terminal flanking region of a universal influenza epitope alters CD4⁺ T-cell repertoire selection. *Nat Commun* 2012; **3**: 665.
24. Pinet V, Vergelli M, Martin R, Bakke O, Long EO. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* 1995; **375**: 603-6.
25. Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol* 2005; **6**: 287-94.
26. Sinnathamby G, Eisenlohr LC. Presentation by recycling MHC class II molecules of an influenza hemagglutinin-derived epitope that is revealed in the early endosome by acidification. *J Immunol* 2003; **170**: 3504-13.
27. Kim A, Hartman IZ, Poore B, Boronina T, Cole RN, Song N, *et al.* Divergent paths for the selection of immunodominant epitopes from distinct antigenic sources. *Nat Commun* 2014; **5**: 5369.
28. Geng J, Pogozheva ID, Mosberg HI, Raghavan M. Use of Functional Polymorphisms To Elucidate the Peptide Binding Site of TAP Complexes. *J Immunol* 2015; **195**: 3436-48.

29. Lam TH, Mamitsuka H, Ren EC, Tong JC. TAP Hunter: a SVM-based system for predicting TAP ligands using local description of amino acid sequence. *Immunome Res* 2010; **6 Suppl 1**: S6.
30. Verweij MC, Rensing ME, Knetsch W, Quinten E, Halenius A, van Bel N, et al. Inhibition of mouse TAP by immune evasion molecules encoded by non-murine herpesviruses. *Mol Immunol* 2011; **48**: 835-45.
31. Eisenlohr LC, Luckashenak N, Apcher S, Miller MA, Sinnathamby G. Beyond the classical: influenza virus and the elucidation of alternative MHC class II-restricted antigen processing pathways. *Immunol Res* 2011; **51**: 237-48.
32. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**: 203-16.
33. Adamopoulou E, Tenzer S, Hillen N, Klug P, Rota IA, Tietz S, et al. Exploring the MHC-peptide matrix of central tolerance in the human thymus. *Nat Commun* 2013; **4**: 2039.
34. Yang Y, Hu L, Zheng H, Mao C, Hu W, Xiong K, et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin* 2013; **34**: 625-35.
35. Kayser S, Boß C, Feucht J, Witte K-E, Scheu A, Bülow H-J, et al. Rapid generation of NY-ESO-1-specific CD4⁺ T-helper 1 cells for adoptive T-cell therapy. *Oncoimmunology* 2015; **4**: e1002723.
36. Lin L, Couturier J, Yu X, Medina MA, Kozinetz CA, Lewis DE. Granzyme B secretion by human memory CD4 T cells is less strictly regulated compared to memory CD8 T cells. *BMC Immunol* 2014; **15**: 36.
37. Chapuis AG, Roberts IM, Thompson JA, Margolin KA, Bhatia S, Lee SM, et al. T-Cell Therapy Using Interleukin-21-Primed Cytotoxic T-Cell Lymphocytes Combined With Cytotoxic T-Cell Lymphocyte Antigen-4 Blockade Results in Long-Term Cell Persistence and Durable Tumor Regression. *J Clin Oncol* 2016; **34**: 3787-95.
38. Mullinax JE, Hall M, Prabhakaran S, Weber J, Khushalani N, Eroglu Z, et al. Combination of Ipilimumab and Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients with Metastatic Melanoma. *Front Oncol* 2018; **8**: 44.

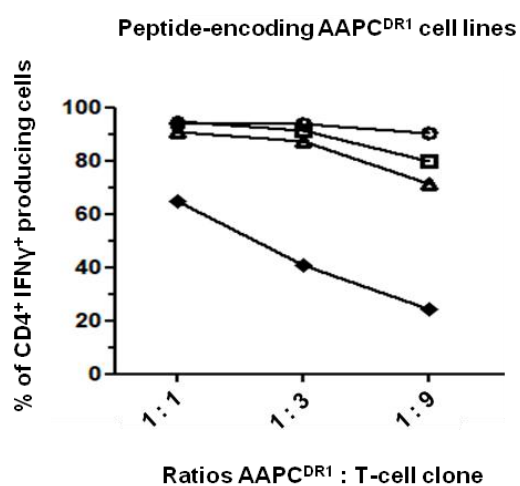
39. van Oosterwijk MF, Juwana H, Arens R, Tesselaar K, van Oers MHJ, Eldering E, et al. CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4⁺ T cells for IL-12-induced Th1 cell development. *Int Immunol* 2007; **19**: 713-8.
40. Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol* 2002; **168**: 4897-906.
41. Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, et al. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* 2001; **167**: 1313-24.
42. Akhmetzyanova I, Zelinsky G, Littwitz-Salomon E, Malyshkina A, Dietze KK, Streeck H, et al. CD137 Agonist Therapy Can Reprogram Regulatory T Cells into Cytotoxic CD4⁺ T Cells with Antitumor Activity. *J Immunol* 2016; **196**: 484-92.
43. Heyder T, Kohler M, Tarasova NK, Haag S, Rutishauser D, Rivera NV, et al. Approach for Identifying Human Leukocyte Antigen (HLA)-DR Bound Peptides from Scarce Clinical Samples. *Mol Cell Proteomics MCP* 2016; **15**: 3017-29.
44. Gilardin L, Delignat S, Peyron I, Ing M, Lone Y-C, Gangadharan B, et al. The ADAMTS131239-1253 peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4⁺ T-cell epitope. *Haematologica* 2017; **102**: 1833-41.



a

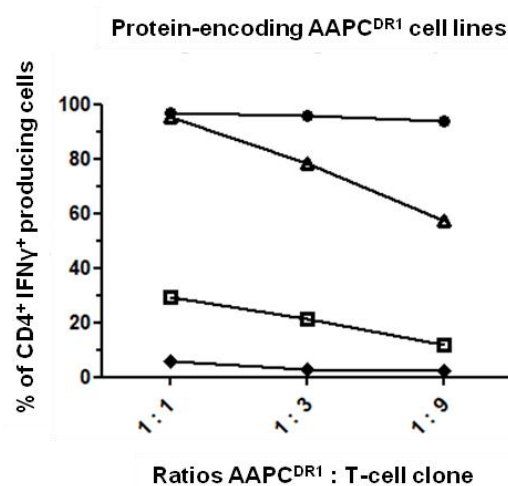


b



- AAPC^{DR1} ER HA pept
- ▲ AAPC^{DR1} Extracell HA pept
- AAPC^{DR1} Endo HA pept
- ◆ AAPC^{DR1} Cyto HA pept

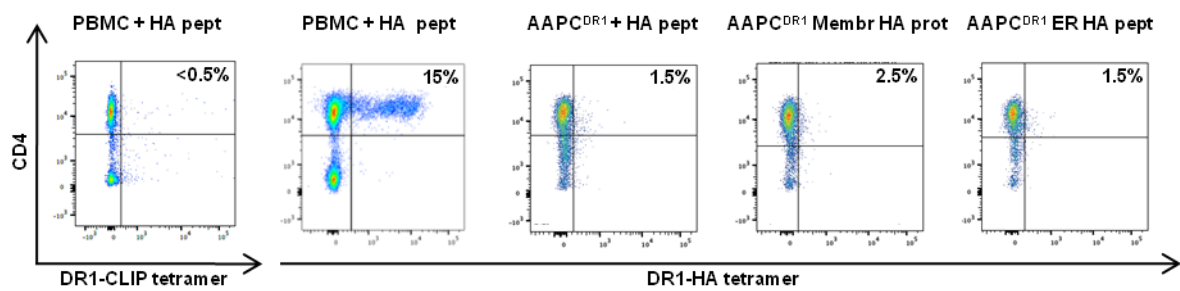
c



- AAPC^{DR1} Membr HA prot
- ▲ AAPC^{DR1} Extracell HA pept
- AAPC^{DR1} Endo HA pept
- ◆ AAPC^{DR1} Cyto HA prot

Figure 2

a



b

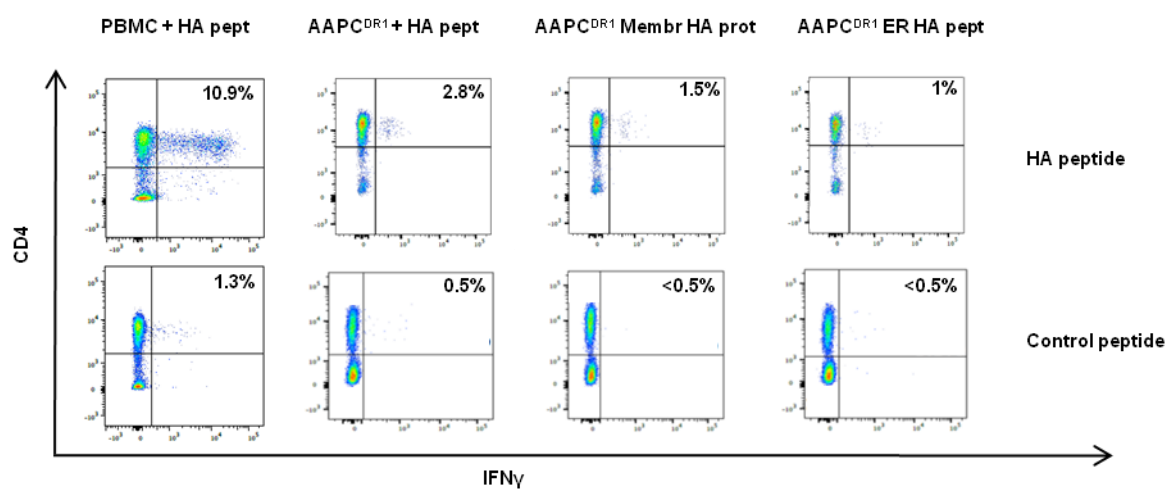


Figure 3

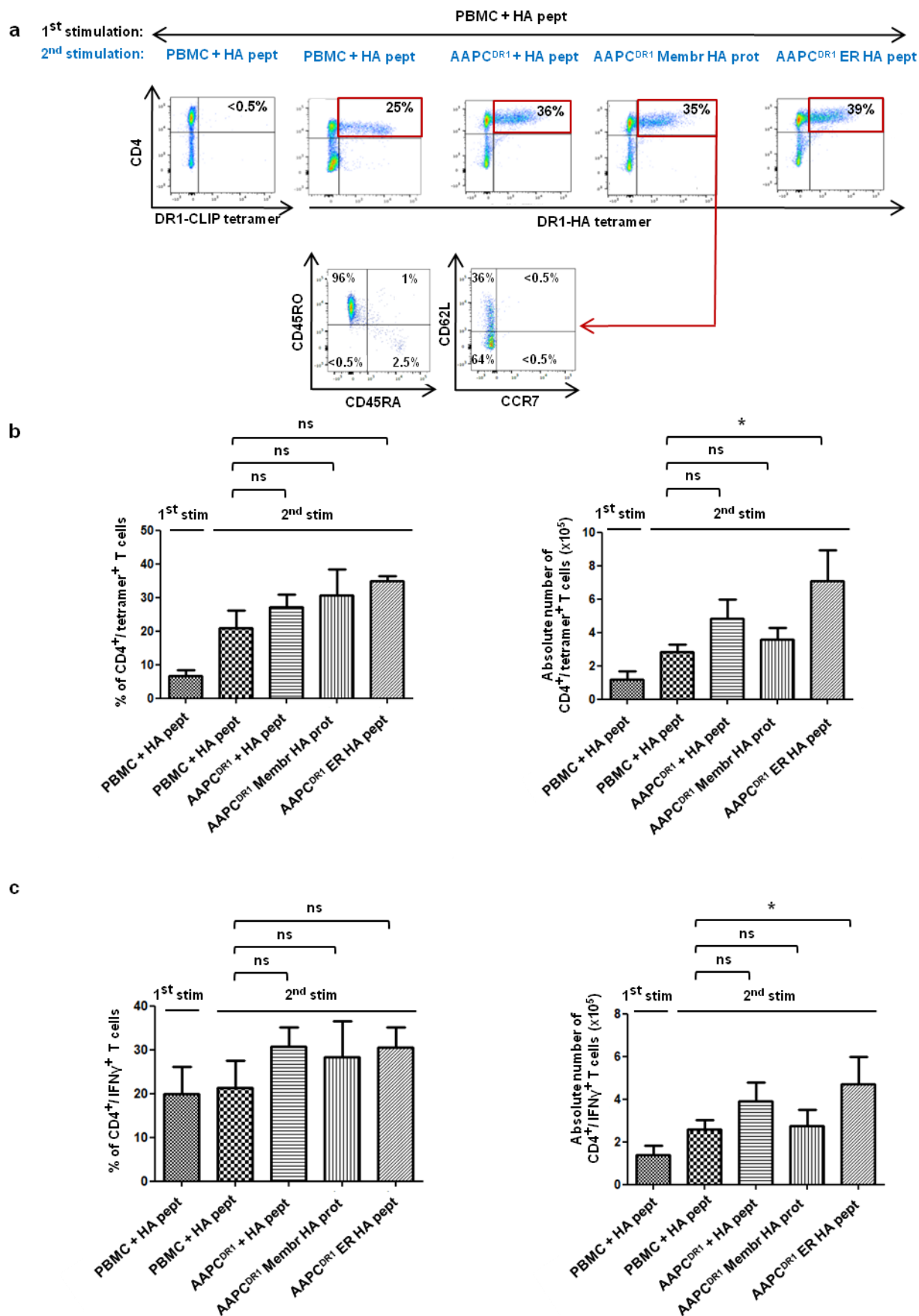
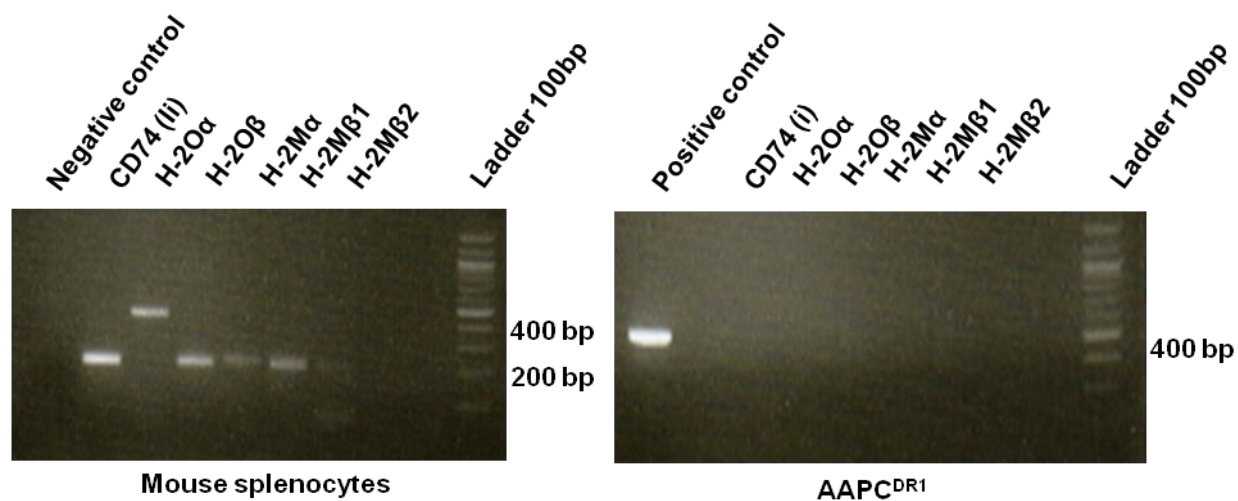
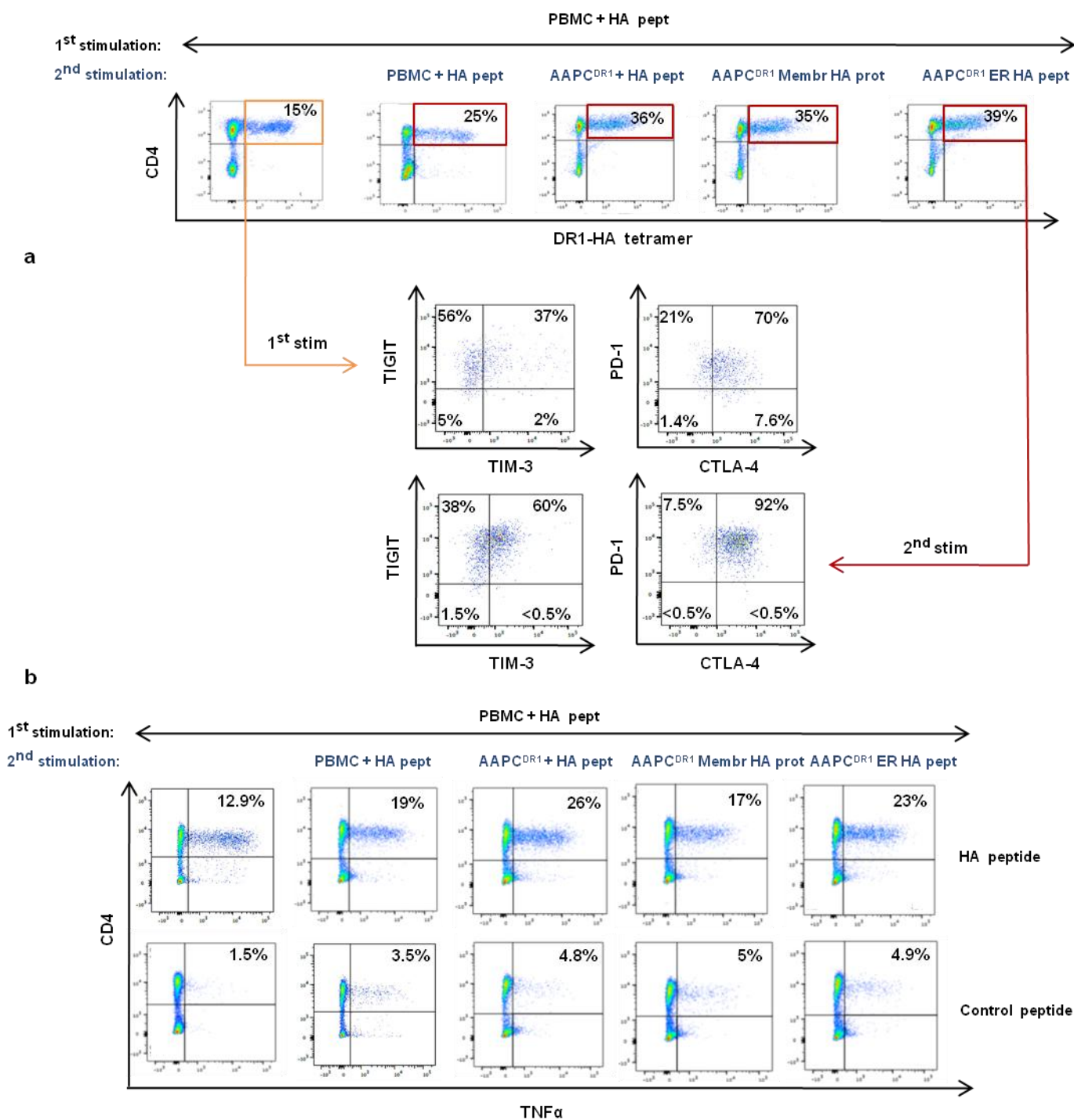


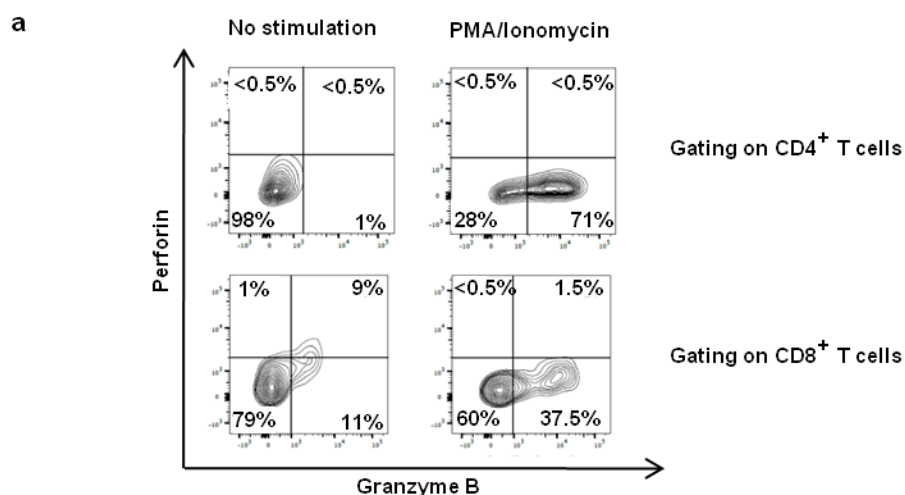
Figure 4



Supplementary Figure 1

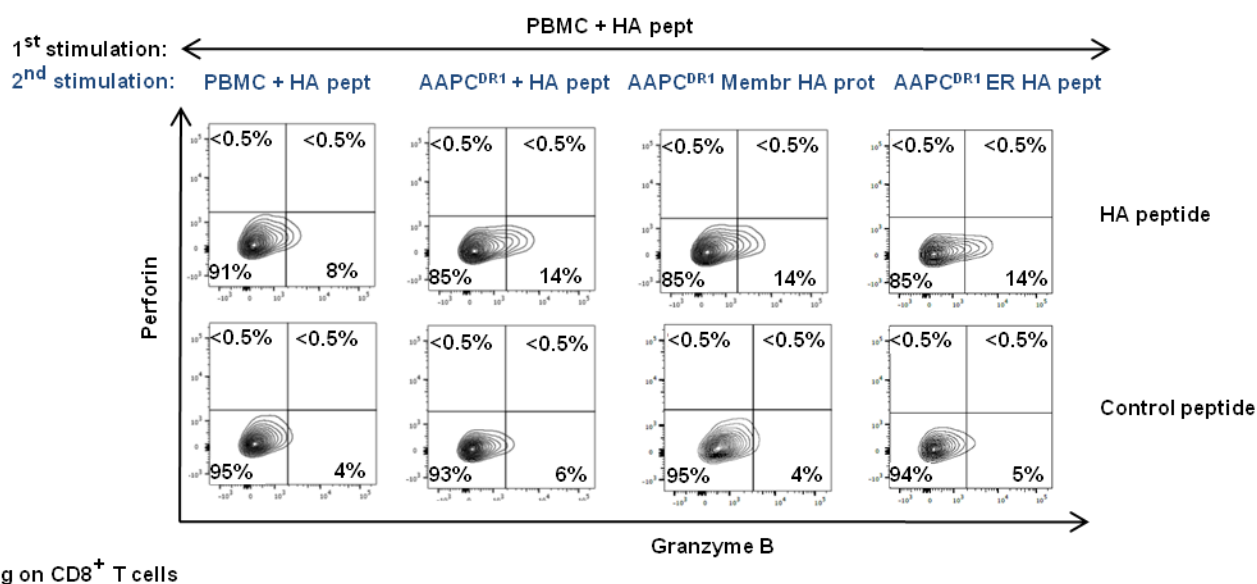


Supplementary Figure 2

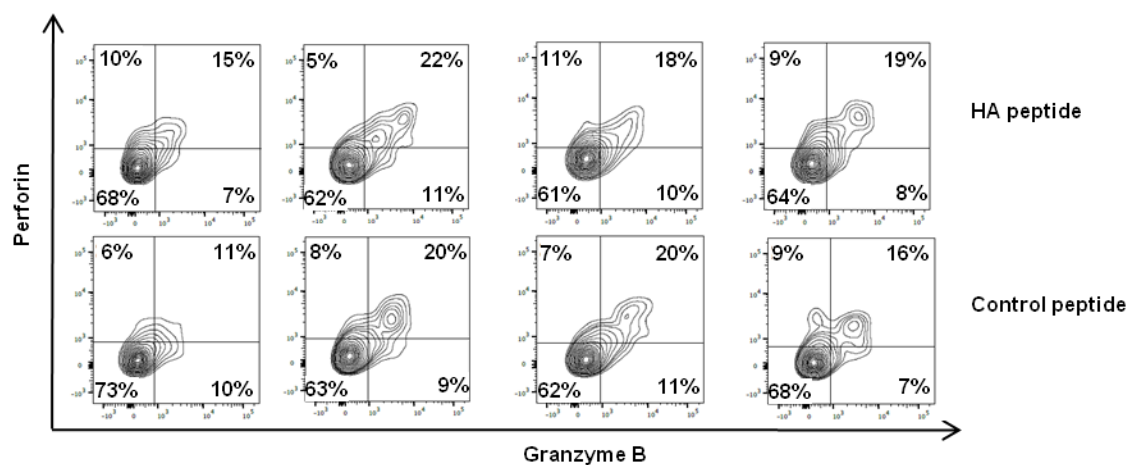


b

Gating on CD4⁺ T cells



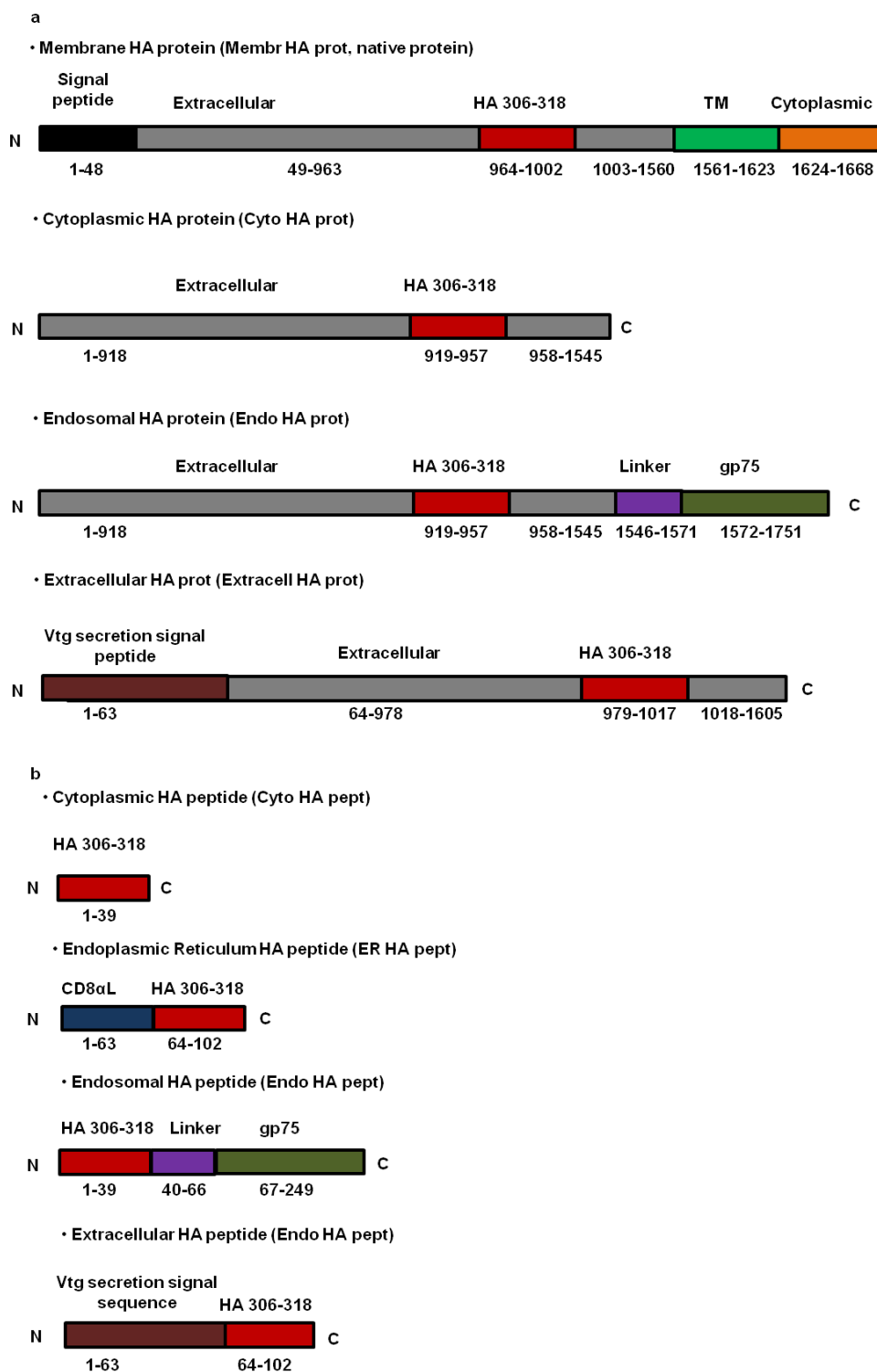
Gating on CD8⁺ T cells



Supplementary Figure 3

Template	Primer's name	5'-primer's sequence-3'
cDNA	Mouse-CD74 -F	GGATGGCGTGAAGTGAAG
	Mouse-CD74 -R	GAGCTGGCCTCTGTCTTCAC
	H-2M α -F	AACGTGATGGATCTGGAAGG
	H-2M α -R	AATGTGTGGTTCTGTGGGTC
	H-2M β 1-F	TGTGAATTTGGGGTGCTG
	H-2M β 1-R	CGGCTCCCTTGTGTAAAAAG
	H-2M β 2-F	CAACCTTTCTGGGATGTGC
	H-2M β 2-R	CTGAGCCGTCTTCTCCTTG
	H-2O α -F	CAACAGCCAGCCCATCAC
	H-2O α -R	ACAGAGGTTGATGCCACTCG
	H-2O β -F	GGAACCTGATGCTGACCAG
	H-2O β -R	GTCACAGAGCAGAGCAGCAG

Supplementary Material and Methods Table 1



Supplementary Material and Methods Figure 1

b

• Cytoplasmic HA peptide (Cyto HA pept)

CTCGAGGCCACCATGCCCAAATACGTGAAGCAGAACACCCCTGAAGCTGGCCACCTGAGAGGATCC

• Endoplasmic Reticulum HA peptide (ER HA pept)

CTCGAGGCCACCATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCTCCAGGCCCTAAATACGTGAAGCAGAACACCCCT
GAAGCTGGCCACCTGAGAGGATCC

• Endosomal HA peptide (Endo HA pept)

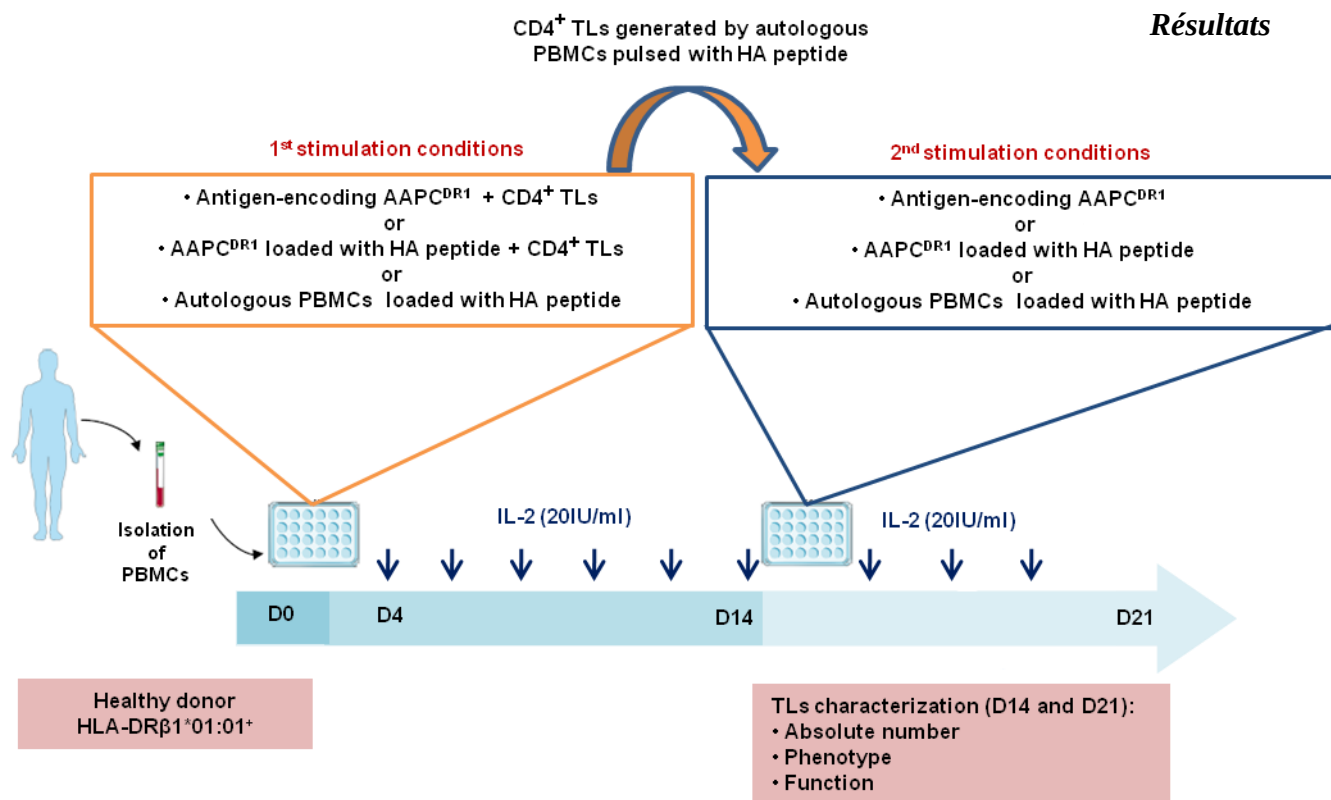
CTCGAGGCCACCATGCCCAAATACGTGAAGCAGAACACCCCTGAAGCTGGCCACCAAGCGGGAAGCGGAGGATCTGGCGGCATCATCAATCGCCGTG
GTGGCTGCTCTGCTGCTGGTGGCAGCCATCTTTGGCGTGGCCTCTTGCCTGATCAGAAGCAGATCCACCAAGAACGAGGCCAACCCAGCCCTGCTGACCGA
CCACTACCAAGATACGCCGAGGACTACGAGGAAGTGCCTAACCCCAACCAACAGCATGGTCTAAGAGGATCC

• Extracellular HA peptide (Extracell HA pept)

CTCGAGGCCACCATGAGAGTGCTGGTGCTGGCCCTGGCCGTGGCTCTGGCTGTGGGCGATCAGAGCAACCTGGGCCCAAATACGTGAAGCAGAACACCC
TGAAGCTGGCCACCTGAGAGGATCC

Cloning sites (5'-XhoI, 3'-BamHI), Kozak sequence, start and stop codons, secretion signal sequence which derived from oreochromis aureus vitellogenin precursor (Vtg) gene, peptide of interest (HA 306-318), CD8α leader sequence, linker sequence, gp75 protein transmembrane and C-ter regions.

Supplementary Material and Methods Figure 2b



Supplementary Material and Methods Figure 3

Figure 1 Phenotype of the AAPC^{DR1} cell lines. Expression of transduced molecules: the eight Ag-encoding AAPC^{DR1} cell lines and the AAPC^{DR1} cell line were stained with anti-human CD54, CD58, CD80 and HLA-DR antibodies. Fluorescence red histograms show the expression levels of transduced molecules. The blue histograms represent isotype controls **(a)**. Expression of mouse MHC-II molecules: mouse splenocytes, NIH/3T3 cells and the AAPC^{DR1} cell line were stained with an anti-mouse I-A/I-E antibody. Fluorescence grey histograms show the expression levels of mouse “classical” MHC-II molecules (I-A/I-E; H-2A, H-2E). The white histograms represent isotype control **(b)**.

Figure 2 Peptide Ag presentation by the AAPC^{DR1} cell lines. AAPC^{DR1} or B-EBV^{DR1} cell lines loaded with HA or control peptide **(a)**, HA peptide-encoding AAPC^{DR1} cell lines **(b)** or HA protein-encoding AAPC^{DR1} cell lines were used to stimulate the HA-specific CD4⁺ T-cell clone **(c)**. Several ratios of stimulating cells to T cells (1 : 1, 1 : 3 and 1 : 9) were performed to discriminate the Ag presentation ability of the AAPC^{DR1} cell lines. Frequencies of activated TLs were evaluated by intracellular IFN- γ staining and FACS analysis. Results show percentages of IFN- γ ⁺ cells among CD4⁺ TLs. A representative experiment from three independent experiments is shown.

Figure 3 Priming of CD4⁺ TLs by the AAPC^{DR1} cell lines or by autologous PBMCs. The AAPC^{DR1} cell lines expressing HA peptide in the ER or HA protein at the plasma membrane, or the AAPC^{DR1} cell line loaded with 10 μ g/ml of HA peptide were used to stimulate purified CD4⁺ TLs for 14 days. Alternatively, autologous PBMCs were cultured with 10 μ g/ml of HA peptide for the same duration. Frequency of HA-specific CD4⁺ effector TLs was evaluated by DR1-HA (or control DR1-CLIP) tetramer staining at day 14. Results show percentages of HA-tetramer⁺ cells among CD4⁺ TLs. A representative experiment is shown from four independent experiments with four donors **(a)** For the same primary culture condition, intracellular IFN- γ staining was also performed after reactivation by the B-EBV^{DR1} cell line loaded with 10 μ g/ml of HA or control peptide. Results show percentages of IFN- γ ⁺ cells among CD4⁺ TLs. A representative experiment is shown from six independent experiments with six donors **(b)**.

Figure 4 Re-stimulation of CD4⁺ TLs by the AAPC^{DR1} cell lines or by autologous PBMCs. TLs generated after primary culture of autologous PBMCs loaded with 10 μ g/ml of HA peptide for 14 days were re-stimulated for 7 additional days by the AAPC^{DR1} cell lines expressing HA peptide in the ER or HA protein at the plasma membrane, or by the AAPC^{DR1} cell line or autologous PBMCs loaded with 10 μ g/ml of HA peptide. Frequency of HA-specific CD4⁺ effector TLs was evaluated by DR1-HA (or control DR1-CLIP) tetramer staining at day 21. Results show percentages of HA-tetramer⁺ cells among CD4⁺ TLs. For the same re-stimulation conditions, the naïve/memory phenotype of the generated CD4⁺ TLs was harvested by flow cytometry using the following antibodies: anti-human CD45RO, CD45RA, CD62L and CCR7. Results show percentages of cells subsets among CD4⁺ HA-

tetramer+ TLs **(a)**. At days 14 and 21, the percentages and absolute numbers of HA-specific TLs were evaluated by tetramer staining. A representative experiment is shown from four independent experiments with four donors **(b)**. They were also evaluated by intracellular IFN- γ staining. A representative experiment is shown from six independent experiments with six donors **(c)**. * $P < 0.05$ (repeated measures of one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's post test); ns, not significant.

Supplementary informations

Supplementary Figure 1 Evaluation of the mouse MHC-II Ag presentation pathway in AAPC^{DR1}. RNAs from mouse splenocytes and AAPC^{DR1} were used to evaluate the expression of mouse invariant chain (CD74) as well as mouse “non-classical” MHC-II molecules, H-2M and H-2O, by RT-PCR.

Supplementary Figure 2 Immuno-regulatory phenotype and cytokine production of re-stimulated CD4+ TLs. TLs were primed by autologous PBMCs loaded with 10 μ g/ml of HA peptide and then re-stimulated by the AAPC^{DR1} cell lines expressing HA peptide in the ER or HA protein at the cell surface, or by the AAPC^{DR1} cell line or autologous PBMCs loaded with 10 μ g/ml of HA peptide. To evaluate the immuno-regulatory phenotype of the CD4+ TLs generated in primary stimulation (day 14) and in re-stimulation (day 21), they were stained with the following antibodies: anti-human TIGIT, TIM-3, PD-1 and CTLA-4. Frequencies of cells subsets are represented on FACS dot plots, gated in CD4+ HA-tetramer+ TLs (orange frame, primary culture at day 14; red frames, re-stimulated TLs at day 21). A representative experiment from two independent experiments with two donors is shown **(a)**. For the same re-stimulation conditions, intracellular TNF- α staining was also performed after reactivation by B-EBV^{DR1} cell line loaded with 10 μ g/ml of HA or control peptide. Results show percentages of TNF- α + cells among CD4+ TLs. A representative experiment is shown from two independent experiments with two donors **(b)**.

Supplementary Figure 3 Evaluation of perforin/granzyme B molecules expression in amplified TLs. After a primary stimulation by HA peptide-loaded autologous PBMCs, effector TLs were re-stimulated by the AAPC^{DR1} cell lines expressing HA peptide in the ER or HA protein at the plasma membrane, or by the AAPC^{DR1} cell line or autologous PBMCs loaded with HA peptide. Intracellular perforin and granzyme B staining were performed in amplified T cells after no reactivation or reactivation by PMA/ionomycin **(a)** or by reactivation with B-EBV^{DR1} cell line loaded with 10 μ g/ml of HA or control peptide. Results show percentages of cells among CD4+ TLs **(b)** and CD8+ TLs **(c)**. A representative experiment is shown from two independent experiments with two donors.

Supplementary Material and Methods Table 1 Primers used for RT-PCR. CD74: invariant chain (Ii), H-2M α : alpha chain of the H-2M molecule (murine homolog of HLA-DM), H-2M β 1: isoform 1 of the beta chain of the H-2M molecule, H-2M β 2: isoform 2 of the beta chain of the H-2M molecule, H-2O α : alpha chain of the H-2O molecule (murine homologue of HLA-DO), H-2O β : beta chain of the H-2O molecule.

Supplementary Material and Methods Figure 1 Ag addressing strategies to target the MHC-II Ag presentation pathway. HA protein addressing strategies were developed to target the plasma membrane, the cytoplasm, endosomes, and the extracellular media. Excepted for the native HA protein which is addressed to the plasma membrane, the others approaches are based on the use of the extracellular domain of HA, coupling or not, to a specific signal peptide to reach the targeted cell compartment (a). HA peptide addressing strategies were developed to target the cytoplasm, the ER, endosomes and the extracellular media. HA peptide is coupling, or not, to a specific signal peptide to reach the targeted cell compartment (b). TM: Transmembrane domain, Vtg: Vitellogenin.

Supplementary Material and Methods Figure 2 Design of Ag cDNAs for cellular targeting of the MHC-II pathway. Sequences of the cDNAs targeting the HA protein to the plasma membrane, cytoplasm, endosome, or extracellular compartment (a). Sequences of the cDNAs targeting the HA peptide Ag to the cytoplasm, the ER, the endosome or the extracellular compartment (b). **Cloning sites (5'-XhoI, 3'-BamHI) sequences, Kozak sequence, start and stop codons, Hemagglutinin (HA) protein signal sequence, secretion signal sequence which derived from oreochromis aureus vitellogenin precursor (Vtg) gene, HA protein (Influenza A virus, A/Aichi/2/1968, H3N2) extracellular region sequence, peptide of interest (HA₃₀₆₋₃₁₈) sequence, HA protein transmembrane region sequence, HA protein cytoplasmic region sequence, CD8 α leader sequence, linker sequence, gp75 transmembrane and Carboxy-terminal protein regions sequences.**

Supplementary Material and Methods Figure 3 *In vitro* stimulation protocol of peripheral blood CD4⁺ TLs by the AAPC^{DR1} cell lines. Primary stimulation of HLA-DR1⁺ healthy donor's CD4⁺ TLs (1x10⁶ cells) was performed with the AAPC^{DR1} cell lines expressing HA peptide in the ER or HA protein at the cell surface (1.5x10⁶) or by the AAPC^{DR1} cell line (1.5x10⁶) loaded with 10 μ g/ml of HA or control peptide for 14 days. This was also done by stimulation of autologous PBMCs (2x10⁶) loaded with 10 μ g/ml of HA or control peptide during the same period. CD4⁺ TLs (1x10⁶, including HA-specific CD4⁺ TLs) generated by autologous PBMCs loaded with HA peptide were then re-stimulated by the AAPC^{DR1} cell lines expressing HA peptide in the ER or HA protein at the plasma membrane (1.5x10⁶), or by the AAPC^{DR1} cell line (1.5x10⁶) or autologous PBMCs (2x10⁶) loaded with 10 μ g/ml of HA or control peptide for 7 additional days. From day 4 to day 19, IL-2 (20 IU/ml) was added to cultures every 2 days. After stimulation (day 14) and re-stimulation (day 21) steps, TLs were characterized by several functional assays.

DISCUSSION

Bien que les LT CD8⁺ soient les principaux acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale, les LT CD4⁺ jouent également un rôle essentiel. En effet, ils renforcent l'action des LT CD8⁺ en favorisant leur « priming », leur prolifération, leur survie, leur fonctionnalité ainsi que le développement de leur réponse mémoire (Borst *et al.*, 2018). De plus, les LT CD4⁺ ont aussi un rôle effecteur direct en inhibant le développement des tumeurs, soit à distance par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α , soit au contact des cellules tumorales par une action cytolytique *via* des mécanismes perforine/granzyme et Fas/FasL (Quezada *et al.*, 2010; Juno *et al.*, 2017). Plusieurs essais cliniques de phase I ont été réalisés avec des clones T CD4⁺ spécifiques d'antigènes de tumeurs, des LT CD4⁺ modifiés avec un TCR transgénique ou encore des TIL spécifiques de néoantigènes (Hunder *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2017). Récemment, grâce aux avancées du NGS, une caractérisation plus précise des néoépitoques tumoraux a permis de mettre en évidence que les LT CD4⁺ avaient une fréquence de reconnaissance des néoantigènes immunogènes plus importante que les LTC (Kreiter *et al.*, 2015). Cette découverte ouvre la voie au développement de nouvelles approches d'immunothérapie anti-tumorale, s'inscrivant pleinement dans le cadre de stratégies de médecine personnalisée.

A- Capacité des CPAA-II chargées de manière exogène avec un antigène d'intérêt à stimuler des LT CD4⁺ spécifiques

Une des principales étapes limitantes des stratégies d'ICA est l'obtention de CPA autologues présentant un phénotype stable et une fonctionnalité suffisante pour générer *in vitro* un nombre suffisant de LT CD4⁺ effecteurs spécifiques dans le plus bref délai. Pour pallier la difficulté d'obtenir de telles CPA, notre groupe a développé un modèle de CPAA basé sur l'utilisation de fibroblastes murins NIH/3T3. Après transduction, ces cellules expriment des molécules essentielles à l'activation de LT CD4⁺ humains : une molécule HLA-II (chaînes α et β) et une molécule de costimulation (ici CD80) à laquelle ont été adjointes des molécules d'adhérence pour renforcer l'activation de ces LT (ici CD54 et CD58). Initialement, nous avons utilisé un modèle de CPAA-II chargé de manière exogène avec l'antigène (Garnier *et al.*, 2016).

Ces cellules présentent des peptides de manière très efficace et sont capables d'endocyter efficacement un antigène protéique et de le dégrader en peptides HLA-II-restreints. En culture primaire, elles sont capables d'activer des LT CD4⁺ spécifiques mais de façon moins efficace que des CPA autologues. Nous avons émis l'hypothèse que la limite majeure de notre modèle était la présentation de xénoantigènes au sein des poches HLA-DR, responsables de stimulation non-spécifique de LT CD4⁺, ou plutôt de stimulation de LT CD4⁺ de spécificité non voulue, au détriment de la réponse vis-à-vis de l'antigène d'intérêt. Nous avons essayé d'inhiber la présentation des xénoantigènes murins par une approche pharmacologique basée sur l'utilisation de la pyrénocine B (travaux de Master 1 d'Amélie Dénier). Chez la souris, il a été rapporté que l'utilisation de cette molécule, un métabolite produit par le champignon *Pyrenochaeta terrestris*, inhibait la présentation d'un antigène endogène par les molécules du CMH-II des DC (Shishido *et al.*, 2014). En revanche, dans notre modèle, l'utilisation de cette molécule s'est révélée inefficace pour bloquer la présentation des xénoantigènes murins. Nous avons également essayé de résoudre ce problème en faisant exprimer, par transfert de gène, la molécule Ii humaine par nos CPAA (travaux de thèse d'Anthony Garnier). Il a déjà été démontré que des CPA humaines déficientes en molécules HLA-DM pouvaient exprimer des complexes HLA-II/CLIP à leur surface (Riberdy *et al.*, 1992). Ainsi, dans nos CPAA, en l'absence d'expression de l'homologue murin de la molécule HLA-DM (H-2M) et de la molécule Ii murine, il est possible que des complexes HLA-II/CLIP, après transfert de la molécule Ii humaine, soient préférentiellement exprimés à leur surface, limitant la présentation d'autres peptides. Le chargement exogène de ces cellules avec le peptide HA permet d'obtenir des complexes HLA-II présentant ce peptide, comme nous avons pu le démontrer avec l'activation d'un clone T CD4⁺ spécifique, et en condition de stimulation primaire, les CPAA exprimant Ii induisent une fréquence deux fois moins importante de LT CD4⁺ non spécifiques ou de spécificité non voulue. Mais elles ne sont malgré tout pas plus efficaces que les CPAA-II standards pour activer des LT CD4⁺ spécifiques.

Ainsi, à cause de la présentation probable de xénoantigènes murins ou d'antigènes présents dans le milieu de culture, il est pour le moment difficile d'envisager l'utilisation de telles CPAA-II en première stimulation dans le but de générer des LT CD4⁺ spécifiques. L'objectif principal de mes travaux de thèse a été d'optimiser et de standardiser la présentation de l'antigène d'intérêt dans les CPAA-II.

Pour ce faire, nous avons généré de nouvelles lignées de CPAA-II (HLA-DR1⁺), exprimant l'antigène d'intérêt (HA) sous forme de peptide ou de protéine, de façon endogène, au niveau des compartiments cellulaires impliqués dans la présentation des antigènes par les molécules du CMH-II.

B- Capacité d'apprêtement antigénique des nouvelles lignées de CPAA-II codant l'antigène d'intérêt

En utilisant un clone T CD4⁺ spécifique du peptide HA, nous avons mis en évidence que la lignée de CPAA-II exprimant le peptide HA au niveau du RE et celle exprimant la protéine HA à la membrane plasmique, avaient les meilleures capacités de présentation de l'antigène. L'adressage d'un peptide d'intérêt dans le RE *via* la séquence signal CD8αL (CD8 *Leader*) humaine a déjà été employé avec nos CPAA-I pour obtenir des réponses T cytotoxiques efficaces (Latouche & Sadelain, 2000). Dans nos CPAA-II, en l'absence des molécules Ii humaine et murine, l'antigène peptidique peut se fixer dans la poche HLA-II au niveau du RE. L'efficacité de présentation de l'antigène par nos CPAA-II exprimant la protéine HA à la surface cellulaire peut être expliquée par le recyclage des molécules HA, et HLA-DR, présentes à la membrane plasmique. Dans des DC mais aussi dans des fibroblastes humains, il a été rapporté que certains épitopes dérivés de HA, résultant d'un dépliement et d'une protéolyse légère de la protéine, se lient à des molécules du CMH-II recyclées au niveau des endosomes précoces. Cette liaison ne requiert ni de molécules CMH-II/Ii néo-synthétisées, ni de molécules HLA-DM présentes au niveau du MIIC (Pinet *et al.*, 1995; Griffin *et al.*, 1997; Sinnathamby & Eisenlohr, 2003; Tewari *et al.*, 2005)

Pour adresser efficacement les antigènes peptidiques et protéiques au niveau des endosomes, nous les avons couplés à la séquence signal de gp75 (Wang *et al.*, 1999; Ahangarani *et al.*, 2009). La faible capacité de présentation de l'antigène des CPAA-II exprimant l'antigène HA au niveau des endosomes ciblés par gp75, est peut-être liée à une protéolyse trop importante conduisant à la génération d'épitopes HA non appropriés, présentés ou pas par les molécules du CMH-II (Vijayasradhi *et al.*, 1995; Tjelle *et al.*, 1996). Cette hypothèse est corroborée par une étude antérieure ayant décrit que le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ était très sensible à la dégradation par les cathepsines (Kim *et al.*, 2014).

Néanmoins, pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de tester des doses croissantes d'inhibiteurs de cathepsines tels que le CA-074Me ou d'inhiber sélectivement certaines cathepsines, telles que les cathepsines B ou L présentes dans les cellules NIH/3T3, par une approche d'ARN interférence (Chambers *et al.*, 1992; Montaser *et al.*, 2002). Il serait également intéressant de réaliser des immuno-marquages combinés entre l'antigène HA et des protéines spécifiques des compartiments cellulaires tels que les endosomes précoces (comme EEA1, *Early Endosome Antigen 1*), les endosomes tardifs et les endolysosomes (comme CD63 et LAMP-2a) pour mieux définir la localisation de l'antigène (Maity *et al.*, 2013).

La stratégie d'adressage visant à cibler le milieu extracellulaire repose sur le couplage de l'antigène HA à la séquence signal de sécrétion de la vitellogénine, rapportée comme favorisant la sécrétion optimale des antigènes dans la lignée cellulaire NIH/3T3 (Tan *et al.*, 2002). Les CPAA-II sécrétant l'antigène HA sont efficaces pour présenter l'antigène, mais elles le sont de façon moins importante que les CPAA-II exprimant le peptide HA au niveau du RE ou la protéine HA à la membrane plasmique. Ceci pourrait résulter d'une capacité d'endocytose insuffisante des CPAA-II.

Les lignées de CPAA-II codant l'antigène HA dans le cytoplasme possèdent les moins bonnes capacités de présentation de l'antigène. Dans le cytosol, la protéine HA est très probablement prise en charge par le protéasome et la machinerie TAP pour suivre le *processing* des antigènes présentés par les molécules du CMH-I. Le clivage par le protéasome pourrait générer des peptides de taille et/ou de séquence non conformes pour être présentés sur des molécules HLA-II (Lam *et al.*, 2010; Geng *et al.*, 2015). Comme montré avec la lignée de CPAA-II codant le peptide HA au niveau du cytoplasme, l'expression cytoplasmique d'un peptide se traduit probablement par une faible capacité de ce peptide à rejoindre le RE pour se lier aux molécules du CMH-II.

Il est maintenant nécessaire de confirmer ces résultats avec un autre antigène. J'ai réalisé d'autres constructions avec l'antigène exprimé dans les mélanomes MELOE-1 (Rogel *et al.*, 2011; Bobinet *et al.*, 2012). Trois lignées de CPAA-II (HLA-DR1⁺) exprimant cet antigène ont été mises au point. La première exprime le peptide MELOE-1₁₃₋₂₇ au niveau du RE, la seconde exprime la protéine à la membrane plasmique et la troisième exprime la protéine native (cytoplasmique). Grâce à notre collaboration avec l'équipe du Dr. Nathalie Labarrière (Inserm UMR1232, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers, Nantes), nous disposons d'un clone T CD4⁺ spécifique de l'épitope MELOE-1₁₃₋₂₇, restreint à la molécule HLA-DR1.

Il nous faudra très prochainement tester la capacité de ces trois lignées de CPAA-II à présenter efficacement l'antigène pour activer le clone T spécifique. Par souci de reproductibilité, il sera également nécessaire de conforter ces résultats avec un autre antigène membranaire tel que l'antigène de tumeur PSMA (*Prostate-Specific Membrane Antigen*) pour lequel des épitopes T CD4⁺ ont été décrits (Schroers *et al.*, 2003b).

C- Capacité des CPAA-II codant l'antigène d'intérêt à stimuler des LT CD4⁺ spécifiques

Après avoir mesuré la capacité de présentation des nouvelles CPAA-II, la suite du travail a été d'évaluer leur aptitude à activer des LT CD4⁺ provenant de sujets sains, en cultures primaires. Nous avons mis en évidence que les lignées de CPAA-II exprimant le peptide HA dans le RE ou exprimant la protéine HA à la membrane plasmique étaient capables de « primer » des LT CD4⁺ spécifiques, mais avec une capacité nettement moins importante que des CPA autologues. Comme montré lors de notre première étude avec les CPAA-II chargées avec l'antigène, les xénoantigènes présentés au sein des molécules HLA-II doivent toujours interférer avec la présentation de notre antigène d'intérêt. Ceci reste actuellement la principale étape limitante de notre modèle. Le fait que nos CPAA expriment l'antigène de façon endogène et constitutive ne suffit sans doute pas à limiter de façon significative la présentation de xénopeptides par les molécules HLA-DR.

Il serait intéressant d'analyser, par cytométrie en flux, le répertoire V β des TCR des LT CD4⁺ stimulés avec nos CPAA-II et de le comparer à celui des cellules générées par des CPA autologues (Tzifi *et al.*, 2013). Ces résultats pourraient nous donner des informations sur la nature des peptides présentés. En effet, dans le cas où une stimulation par des CPA autologues générerait un répertoire oligoclonal et qu'une stimulation par nos CPAA-II générerait un répertoire plus polyclonal, il serait possible d'envisager la présentation par ces dernières d'une diversité importante de xénopeptides. Pour compléter ces données, il serait également intéressant d'immuno-précipiter les complexes HLA/peptide présents à la surface de nos CPAA-II et de caractériser les peptides élués par spectrométrie de masse, comme cela a déjà été réalisé avec nos CPAA-I lors des travaux de thèse du Dr Hafid Kora (Kora *et al.*, article en cours de soumission). Ainsi, nous pourrions analyser la diversité des peptides présentés au sein des poches HLA-II. Dans le cas où ces xénopeptides seraient issus d'une minorité d'antigènes murins endogènes, l'inhibition spécifique de leur expression par ARN interférence par exemple, pourrait conduire à une forte diminution des réponses T CD4⁺ non spécifiques.

L'adressage de notre peptide d'intérêt dans le RE, *via* le peptide signal CD8 α L, se fait de façon indépendante de la machinerie TAP. Pour inhiber l'apport de xénopeptides endogènes dans le RE, il serait donc possible d'utiliser un inhibiteur de ce transporteur. Ce mécanisme est utilisé par plusieurs virus pour masquer leur présence au SI. Il a déjà été rapporté que les protéines UL49.5 et US6, dérivant respectivement des virus HPV-1 bovin et CMV humain, apportées par transfert de gène dans des cellules NIH/3T3, présentaient une réelle efficacité pour bloquer ce transporteur et réduire la présentation d'antigènes endogènes, sans induire de toxicité (Verweij *et al.*, 2011). Il existe une voie alternative de présentation des antigènes résultant de la présentation d'antigènes endogènes sur les molécules HLA-II. Chez l'homme, il a été montré que près de 30% des antigènes présentés au sein des molécules HLA-II provenaient d'antigènes endogènes (Adamopoulou *et al.*, 2013). Cette présentation alternative peut se faire par des mécanismes d'autophagie, des antigènes cytosoliques rejoignent la voie classique de présentation des antigènes par les molécules du CMH-II (Roche & Furuta, 2015). Il serait donc très intéressant de tester des inhibiteurs d'autophagie sur nos CPAA-II pour voir si nous pourrions restreindre la présentation de xénoantigènes murins endogènes. A ce titre, une molécule telle que la bafilomycine A1, qui inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, pourrait être testée dans notre modèle (Yang *et al.*, 2013).

Pour renforcer la capacité de stimulation de nos CPAA-II, il serait très intéressant de combiner les stratégies d'adressage les plus efficaces pour présenter l'antigène. Ainsi, nous pourrions mettre au point une lignée de CPAA-II qui exprimerait l'antigène d'intérêt sous forme peptidique au niveau du RE et sous forme protéique à la membrane plasmique, qui pourrait également être chargée de façon exogène avec le peptide d'intérêt.

Pour s'affranchir de la xénoréactivité, il serait intéressant de développer des CPAA-II humaines cultivées en sérum humain. En utilisant la technologie CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr associated protein 9*), il serait envisageable de supprimer l'expression des gènes HLA-I et HLA-II des cellules utilisées pour ensuite faire exprimer, par transfert de gène, la molécule HLA-II d'intérêt. Cette approche a déjà été rapportée pour la mise au point de CPAA-I basées sur l'utilisation de cellules HEK, et elle s'avère efficace pour générer des LT CD8⁺ spécifiques d'antigène de tumeur (Hong *et al.*, 2017). Dans ce nouveau modèle de CPAA-II humanisées, il faudrait évaluer l'alloréactivité générée contre les antigènes mineurs d'histocompatibilité et la comparer à la xénoréactivité obtenue avec nos CPAA-II murines.

D- Capacité des CPAA-II codant l'antigène d'intérêt à restimuler des LT CD4⁺ mémoires

Dans le cadre d'une ICA, il est nécessaire d'avoir des LT CD4⁺ fonctionnels qui persistent *in vivo*. Dans cette optique, nous avons évalué la capacité des CPAA-II à amplifier des cellules T mémoires. Nous avons démontré que les CPAA-II codant le peptide HA au niveau du RE sont plus efficaces que des CPAA-II chargées avec l'antigène, mais aussi significativement plus efficaces que des CPA autologues pour amplifier des LT CD4⁺ mémoires fonctionnels. Cette nouvelle lignée de CPAA-II, standardisée et prête à l'emploi, représente donc un atout majeur pour le développement de nouvelles approches d'ICA. A l'issue du protocole d'activation et d'amplification *in vitro*, les LT CD4⁺ spécifiques générés par ces CPAA-II sont des cellules Th1 produisant de l'IFN- γ et du TNF- α , dont le phénotype est majoritairement effecteur mémoire. D'autre part, nous avons identifié un contingent d'effecteurs exprimant le granzyme B mais pas la perforine. L'expression de granzyme B a déjà été rapportée comme étant une caractéristique des cellules Th1 mémoires (Lin *et al.*, 2014). Ces LT effecteurs amplifiés partagent donc des propriétés avec ceux utilisés dans les stratégies d'ICA anti-tumorale. De plus, à l'issue du protocole d'amplification *in vitro*, le nombre de LT CD4⁺ mémoires fonctionnels générés par les CPAA-II codant le peptide dans le RE est compatible avec une utilisation dans le cadre d'une ICA (Hunder *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2017). Cependant, il reste nécessaire de caractériser plus finement ces effecteurs, d'une part en élargissant l'étude de leur production de cytokines et d'autre part en évaluant leur fonction cytolytique *in vitro*. Pour ce faire, nous pourrions réaliser des essais cytotoxiques en utilisant la technique du relargage d'Europium (Rossignol *et al.*, 2017). Nous pourrions également, par cytométrie en flux, quantifier l'expression du marqueur de dégranulation CD107a et de la molécule FasL à la surface des LT CD4⁺ (Juno *et al.*, 2017).

L'analyse des effecteurs obtenus après amplification met en évidence un niveau élevé d'expression des molécules d'immuno-régulation TIGIT, TIM-3, CTLA-4 et PD-1, ce qui représente un obstacle potentiel à l'efficacité de ces cellules *in vivo*. Dans ce contexte, l'utilisation d'anticorps *anti-checkpoints* couplée à celle du produit de thérapie cellulaire pourrait être utile (Chapuis *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2018; Mullinax *et al.*, 2018). Actuellement, parmi ces molécules, PD-1 apparaît comme une cible privilégiée des stratégies *anti-checkpoints*. J'ai construit des CPAA-II exprimant PD-L1, dans le but d'étudier l'impact

d'une interaction PD-1/PD-L1 sur la survie des LT CD4⁺ effecteurs par des marquages annexine V et 7-AAD (7-AminoActinomycine D).

La modulation du signal de costimulation apporté par les CPAA-II est une approche intéressante pour obtenir un phénotype mémoire moins différencié et également optimiser la fonctionnalité des effecteurs. Deux molécules apparaissent particulièrement prometteuses : CD70 et 4-1BBL, interagissant respectivement avec les récepteurs CD27 et 4-1BB, exprimés à la surface des LT. En effet, l'interaction CD27/CD70 participe à la différenciation Th1 et favorise la survie des LT CD4⁺ (van Oosterwijk *et al.*, 2007; Kawamura *et al.*, 2011). Les signaux médiés par l'interaction de 4-1BB avec son ligand améliorent la prolifération et la fonctionnalité des LT CD4⁺ (Cannons *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2002; Akhmetzyanova *et al.*, 2016). Un autre paramètre qui pourrait également être modulé pour contrôler l'état de différenciation des cellules est le milieu cytokinique. L'impact de l'IL-7 et/ou de l'IL-15 sur le phénotype mémoire sera à évaluer. Ces deux cytokines ont déjà été utilisées en support de l'IL-2, au cours de protocoles *in vitro* d'amplification de LT CD4⁺ anti-tumoraux, pour générer des effecteurs moins différenciés de phénotype centraux mémoires (Kayser *et al.*, 2015).

E- Optimisation du protocole *in vitro* d'activation et d'amplification de LT CD4⁺ spécifiques

Les CPA autologues sont très efficaces pour activer des LT CD4⁺ spécifiques. Néanmoins, leur capacité d'activation dans notre protocole peut être améliorée. Il est envisageable de trier les cellules CD4⁺ à partir des PBMC totaux, puis d'irradier la fraction CD4⁺ et de l'utiliser comme source de CPA autologues (Lin *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2017), l'étape d'irradiation améliorant la capacité de présentation antigénique des LB et des DC par surexpression des molécules du CMH-II et de CD70 (Chiriva-Internati *et al.*, 2006; Mortara *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011; Accolla *et al.*, 2014).

En partant d'un plus grand nombre de PBMC, il serait possible de générer un nombre de LT CD4⁺ spécifiques suffisamment important pour étudier de façon précise leur phénotype naïf/mémoire et pour les trier avant de les restimuler avec des CPAA-II afin d'obtenir une population pure de LT CD4⁺ spécifiques, pré-requis à une utilisation de tels lymphocytes en thérapeutique (les LT CD4⁺ non spécifiques, ou de spécificité non voulue, pouvant avoir des effets délétères *in vivo*). Il serait intéressant de savoir si nos CPAA-II sont capables de stimuler des cellules mémoires de phénotype moins différencié comme des LT_{SCM} et/ou des LT_{CM} spécifiques d'antigène, dont les propriétés de persistance *in vivo* peuvent améliorer l'efficacité des ICA anti-tumorales (Turtle *et al.*, 2009; Muranski *et al.*, 2011). Dans un premier temps, le tri des cellules T CD4⁺ spécifiques pourrait se faire non seulement *via* l'utilisation de billes magnétiques couplées à un anticorps reconnaissant le fluorochrome conjugué à des multimères HLA-II spécifiques, mais aussi *via* l'utilisation de billes magnétiques couplées de façon covalente à la streptavidine reconnaissant des monomères HLA-II spécifiques biotinylés (*cf* travaux de thèse du Dr Estelle Dupel portant sur l'optimisation d'un tri de LTC spécifiques avant restimulation par des CPAA-I). Dans un second temps, il serait envisageable de trier par cytométrie en flux les cellules spécifiques de phénotype moins différencié qui auront été obtenues afin de les restimuler par des CPAA-II.

F- Autres intérêts des CPAA-II

Ces CPAA représentent un outil intéressant pour analyser sur un plan fondamental les réponses physiologiques, *in vitro*, en termes de spécificité peptidique. Les propriétés de ces cellules ont pu être exploitées par plusieurs équipes collaboratrices dont celles du Dr Laurent Gilardin et du Dr Sophie Sibénil (Inserm UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris). Les travaux du Dr Laurent Gilardin se sont focalisés sur l'antigène ADAMTS13 (*A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats-13*), une métalloprotéase qui permet le clivage du facteur von Willebrand, essentiel à la coagulation (Gilardin *et al.*, 2017). Chez l'homme, un déficit en protéine ADAMTS13 entraîne une pathologie auto-immune : le purpura thrombotique thrombocytopénique qui est causé par la présence d'auto-anticorps dirigés contre cette protéine. Le Dr Laurent Gilardin a étudié les épitopes qui sont à l'origine d'une réponse T CD4⁺ contre cet antigène. Pour ce faire, des souris transgéniques HLA-DR1 ont été immunisées avec la protéine ADAMTS13. Ensuite, des CPAA HLA-DR1⁺ ont été utilisées *in vitro*, chargées de manière exogène pour présenter les différents peptides candidats, prédits *in silico*. Cette étude a permis d'identifier un peptide immunodominant (ADAMTS13₁₂₃₉₋₁₂₅₃), restreint à la présentation HLA-DR1 et reconnu par les LT CD4⁺. Avec une approche similaire, le Dr Sophie Sibénil s'est intéressée à la réponse T CD4⁺ pouvant être induite, lors des traitements par anticorps anti-CD20, contre cet antigène exprimé dans les lymphomes B (Milcent *et al.*, en cours de soumission). Pour cela, des souris transgéniques HLA-DR1 ont été immunisées avec une lignée murine de lymphome exprimant la molécule CD20 humaine (EL4-huCD20). Des CPAA HLA-DR1⁺ ont ensuite été incubées avec différents peptides issus de cet antigène, et elles ont été utilisées pour stimuler des LT CD4⁺ murins. Il a été identifié plusieurs peptides capables d'induire une forte réponse T CD4⁺. Le Pr Christian Boitard (Inserm UMR1016, Institut Cochin, Paris) s'intéresse aux réponses T CD4⁺, restreintes HLA-DQ8, contre l'antigène de la pré-pro-insuline dans le cadre du DT1. De ce fait, des CPAA HLA-DQ8⁺, en cours de construction, pourraient être également un très bon outil pour caractériser de nouveaux épitopes impliqués dans la physiopathologie de ce diabète. Ces différentes collaborations valident l'intérêt de nos CPAA-II pour identifier des nouveaux épitopes d'intérêt clinique et pour *monitorer* des réponses T CD4⁺ spécifiques.

Dans le cadre des cancers, l'intérêt des CPAA pour identifier de nouvelles cibles immunogéniques pourrait s'avérer très utile dans le cadre du développement de nouvelles stratégies d'ICA. En fonction du statut mutationnel des patients, l'immunogénicité de néoépitopes prédits *in silico* comme étant affins pour la molécule HLA-A*0201 (A2.1) a été validée *in vitro* grâce à nos CPAA de classe I HLA-A2.1⁺ (Maby *et al.*, 2015). Ces néoépitopes ont permis d'activer des LTC de patients capables de lyser des cellules tumorales. La possibilité à partir de nos CPAA de caractériser des épitopes immunogènes pourrait également s'avérer très utile pour définir des cibles classe II d'intérêt thérapeutique dans des approches vaccinales anti-tumorales (Hu *et al.*, 2018).

Nos CPAA sont également bien adaptées pour étudier les interactions récepteurs/ligands au cours des réponses lymphocytaires. Elles possèdent un potentiel intéressant pour mettre en évidence des voies immuno-stimulatrices et/ou immuno-régulatrices qui pourraient conduire au développement de nouvelles approches d'immunothérapie humorale, basées sur l'utilisation de molécules agonistes ou antagonistes, pour potentialiser les réponses cellulaires anti-tumorales (Mayes *et al.*, 2018).

Des travaux menés par notre groupe ont aussi mis en évidence que nos CPAA-II étaient tout aussi adaptées pour générer des Treg spécifiques. Des LT CD4⁺ (CD25⁺ et CD25⁻) ont été stimulés pendant sept jours par des CPA autologues chargées avec le peptide d'intérêt (HA) en présence d'IL-2 et de rapamycine. Cette stimulation a été suivie d'une étape de restimulation par des CPA autologues ou des CPAA-II chargées avec le peptide d'intérêt, pendant sept à dix jours additionnels, dans les mêmes conditions de culture. Nous avons mis en évidence que les CPAA-II étaient tout aussi efficaces que les CPA autologues pour amplifier des Treg spécifiques et fonctionnels, possédant une forte capacité immunosuppressive (travaux de Master 2 de Pierre Trémolières). Ce protocole pourrait être optimisé pour générer des Treg spécifiques d'alloantigènes ou d'auto-antigènes d'intérêt thérapeutique, dans le cadre des maladies auto-immunes ou des rejets de greffe. Ce type d'approche a déjà été validé dans le cadre du DT1 avec des Treg polyclonaux (Bluestone *et al.*, 2015).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les conditions d'activation et d'amplification optimales de LT CD4⁺ humains spécifiques restent un domaine peu exploré. Les CPAA-II nouvellement construites représentent un outil particulièrement bien adapté pour étudier les réponses T CD4⁺. Ces CPAA sont phénotypiquement stables, présentent efficacement l'antigène et amplifient des cellules Th1 mémoires fonctionnelles de façon reproductible et significativement plus efficace que des CPA autologues.

Suite à l'étude réalisée ici avec l'antigène HA, il est maintenant nécessaire de valider l'ensemble de nos résultats avec un autre antigène. Pour ce faire, nous évaluerons la capacité de CPAA-II exprimant l'antigène MELOE-1 (*cf* section B de la discussion) à générer des effecteurs T CD4⁺ spécifiques de cet antigène *in vitro*, à partir du sang périphérique de sujets sains et de patients atteints de mélanome. Le phénotype de ces effecteurs sera caractérisé. Leur fonctionnalité sera évaluée *in vitro*, notamment quant à leur implication dans la lyse de cellules tumorales, directement ou indirectement en soutenant les réponses T CD8⁺. Elle sera ensuite évaluée *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficientes (souris NSG, *Nod Scid Gamma*) chez lesquelles des cellules de mélanome humaines exprimant MELOE-1 seront greffées avant l'injection de LT CD4⁺ humains anti-MELOE-1 (Carrillo *et al.*, 2018). Pour consolider les résultats obtenus, ces études *in vitro* et *in vivo* devront aussi être réalisées avec un troisième antigène, comme l'antigène de tumeur PSMA.

Il serait également très intéressant d'utiliser un modèle de souris immunocompétentes humanisées comme celui des souris transgéniques HLA-DR1. Ce modèle murin sous-entend non seulement de construire des CPAA-II « hybrides » exprimant la molécule HLA-DR1 et des molécules de costimulation murines, mais aussi d'ajouter des cytokines murines *in vitro* afin d'activer des LT CD4⁺ murins anti-tumoraux HLA-DR1-restreints. Ce modèle, plus « physiologique » devrait nous donner des informations plus précises quant aux conditions d'induction et de persistance de la réponse anti-tumorale médiée par les LT injectés. Afin d'étudier la complémentarité des réponses T CD4⁺ et T CD8⁺, il serait également envisageable d'utiliser des souris humanisées immunocompétentes double transgéniques HLA-A2.1/HLA-DR1 (Rangan *et al.*, 2017). Pour ce faire, nous pourrions construire des CPAA « hybrides » exprimant les molécules HLA-A2.1 et HLA-DR1 ainsi que des molécules de costimulation murines pour activer des LT CD8⁺ murins HLA-A2.1-restreints et des LT

CD4⁺ murins HLA-DR1-restreints, contre un même antigène tumoral, ou contre des antigènes tumoraux différents. Nous disposons déjà au laboratoire d'une lignée de cellules tumorales murines (SARC) HLA-A2.1⁺/HLA-DR1⁺ exprimant l'antigène MELOE-1 qui pourrait être utilisée dans ce type d'étude.

C'est la première fois, à notre connaissance, que la machinerie de présentation de l'antigène est ainsi détournée pour favoriser la présentation d'un antigène endogène sur une molécule HLA-II. Nos CPAA-II « endogènes » constituent un outil unique pour amplifier des LT CD4⁺ spécifiques et fonctionnels, de façon reproductible et standardisée. Nos résultats ouvrent la voie au développement de nouvelles approches d'ICA basées sur l'utilisation de LT CD4⁺ effecteurs, dans le cadre des cancers et des pathologies infectieuses, et sur l'utilisation de LT CD4⁺ régulateurs, dans le cadre des maladies auto-immunes et des rejets de greffe.

REFERENCES

- Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, et al. 2013.** Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nature Immunology* **14**: 307–308.
- Accolla R, Lombardo L, Abdallah R, Raval G, Forlani G, Tosi G. 2014.** Boosting the MHC Class II-Restricted Tumor Antigen Presentation to CD4⁺ T Helper Cells: A Critical Issue for Triggering Protective Immunity and Re-Orienting the Tumor Microenvironment Toward an Anti-Tumor State. *Frontiers in Oncology* **4**.
- Adamopoulou E, Tenzer S, Hillen N, Klug P, Rota IA, Tietz S, Gebhardt M, Stevanovic S, Schild H, Tolosa E, et al. 2013.** Exploring the MHC-peptide matrix of central tolerance in the human thymus. *Nature Communications* **4**: 2039.
- Agarwal N, Padmanabh S, Vogelzang NJ. 2012.** Development of novel immune interventions for prostate cancer. *Clinical Genitourinary Cancer* **10**: 84–92.
- Ahangarani RR, Janssens W, VanderElst L, Carlier V, VandenDriessche T, Chuah M, Weynand B, Vanoirbeek JAJ, Jacquemin M, Saint-Remy J-M. 2009.** In vivo induction of type 1-like regulatory T cells using genetically modified B cells confers long-term IL-10-dependent antigen-specific unresponsiveness. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **183**: 8232–8243.
- Ahearne MJ, Willimott S, Piñon L, Kennedy DB, Miall F, Dyer MJS, Wagner SD. 2013.** Enhancement of CD154/IL4 proliferation by the T follicular helper (Tfh) cytokine, IL21 and increased numbers of circulating cells resembling Tfh cells in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* **162**: 360–370.
- Ahmed R, Bevan MJ, Reiner SL, Fearon DT. 2009.** The precursors of memory: models and controversies. *Nature Reviews. Immunology* **9**: 662–668.
- Ahmed R, Gray D. 1996.** Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science (New York, N.Y.)* **272**: 54–60.
- Ahmed R, Roger L, Costa Del Amo P, Miners KL, Jones RE, Boelen L, Fali T, Elemans M, Zhang Y, Appay V, et al. 2016.** Human Stem Cell-like Memory T Cells Are Maintained in a State of Dynamic Flux. *Cell Reports* **17**: 2811–2818.
- Ahrends T, Spanjaard A, Pilzecker B, Bąbala N, Bovens A, Xiao Y, Jacobs H, Borst J. 2017.** CD4⁺ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* **47**: 848-861.e5.
- Aichinger G, Lechler RI. 1995.** Endogenous pathway of class II presentation. *Biochemical Society Transactions* **23**: 657–660.
- Akhmetzyanova I, Zelinskyy G, Littwitz-Salomon E, Malyshkina A, Dietze KK, Streeck H, Brandau S, Dittmer U. 2016.** CD137 Agonist Therapy Can Reprogram Regulatory T

Cells into Cytotoxic CD4⁺ T Cells with Antitumor Activity. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) **196**: 484–492.

Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T, Matsuda H, Aoki T, Yagita H, Okumura K. 2000. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine* **191**: 375–380.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale A-L, et al. 2013. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**: 415–421.

Alfonso C, Karlsson L. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annual Review of Immunology* **18**: 113–142.

Andre F, Schartz NEC, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, Pomel C, Lhomme C, Escudier B, Le Chevalier T, et al. 2002. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet (London, England)* **360**: 295–305.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. 2009. Human Th17 cells: Are they different from murine Th17 cells?: FORUM. *European Journal of Immunology* **39**: 637–640.

Azizi G, Rastegar Pouyani M, Navabi S sadat, Yazdani R, Kiaee F, Mirshafiey A. 2015. The Newly Identified T Helper 22 Cells Lodge in Leukemia. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* **9**: 143–154.

Balachandran VP, Łuksza M, Zhao JN, Makarov V, Moral JA, Remark R, Herbst B, Askan G, Bhanot U, Senbabaoglu Y, et al. 2017. Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature* **551**: 512–516.

Ballesteros-Tato A, León B, Graf BA, Moquin A, Adams PS, Lund FE, Randall TD. 2012. Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper differentiation. *Immunity* **36**: 847–856.

Banuelos J, Lu NZ. 2016. A gradient of glucocorticoid sensitivity among helper T cell cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **31**: 27–35.

Bedford P, Garner K, Knight SC. 1999. MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *International Immunology* **11**: 1739–1744.

Ben Ahmed M, Belhadj Hmida N, Moes N, Buyse S, Abdeladhim M, Louzir H, Cerf-Bensussan N. 2009. IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) **182**: 6763–6770.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics* **27**: 20–21.

- van de Berg PJ, van Leeuwen EM, ten Berge IJ, van Lier R. 2008.** Cytotoxic human CD4(+) T cells. *Current Opinion in Immunology* **20**: 339–343.
- van Bergen J, Schoenberger SP, Verreck F, Amons R, Offringa R, Koning F. 1997.** Efficient loading of HLA-DR with a T helper epitope by genetic exchange of CLIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 7499–7502.
- Berkers CR, de Jong A, Schuurman KG, Linnemann C, Meiring HD, Janssen L, Neefjes JJ, Schumacher TNM, Rodenko B, Ovaa H. 2015.** Definition of Proteasomal Peptide Splicing Rules for High-Efficiency Spliced Peptide Presentation by MHC Class I Molecules. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **195**: 4085–4095.
- Bevan MJ. 1976.** Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *The Journal of Experimental Medicine* **143**: 1283–1288.
- Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathenson SG. 2006.** B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunology Letters* **104**: 70–75.
- Biasco L, Scala S, Basso Ricci L, Dionisio F, Baricordi C, Calabria A, Giannelli S, Cieri N, Barzaghi F, Pajno R, et al. 2015.** In vivo tracking of T cells in humans unveils decade-long survival and activity of genetically modified T memory stem cells. *Science Translational Medicine* **7**: 273ra13.
- Bikoff E, Birshtein BK. 1986.** T cell clones specific for IgG2a of the a allotype: direct evidence for presentation of endogenous antigen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **137**: 28–34.
- Bikoff EK, Eckhardt LA. 1989.** Presentation of IgG2a antigens to class II-restricted T cells by stably transfected B lymphoma cells. *European Journal of Immunology* **19**: 1903–1909.
- Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, Angell H, Fredriksen T, Lafontaine L, Berger A, et al. 2013.** Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* **39**: 782–795.
- Bioley G, Jandus C, Tuyaeerts S, Rimoldi D, Kwok WW, Speiser DE, Tiercy J-M, Thielemans K, Cerottini J-C, Romero P. 2006.** Melan-A/MART-1-specific CD4 T cells in melanoma patients: identification of new epitopes and ex vivo visualization of specific T cells by MHC class II tetramers. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **177**: 6769–6779.
- Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, Herold KC, Lares A, Lee MR, Li K, et al. 2015.** Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science Translational Medicine* **7**: 315ra189.
- Bobinet M, Vignard V, Rogel A, Khammari A, Dreno B, Lang F, Labarriere N. 2012.** MELOE-1 antigen contains multiple HLA class II T cell epitopes recognized by Th1 CD4+ T cells from melanoma patients. *PloS One* **7**: e51716.

- Borst J, Ahrends T, Bąbala N, Melief CJM, Kastenmüller W. 2018.** CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*.
- Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. 2002.** A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science (New York, N.Y.)* **297**: 2060–2063.
- Boyman O, Sprent J. 2012.** The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews. Immunology* **12**: 180–190.
- Brentjens RJ, Latouche J-B, Santos E, Marti F, Gong MC, Lyddane C, King PD, Larson S, Weiss M, Rivière I, et al. 2003.** Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nature Medicine* **9**: 279–286.
- ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. 2013.** MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**: a016873.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. 1991.** A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)* **254**: 1643–1647.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. 2001.** Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* **27**: 68–73.
- Bruno A, Pagani A, Pulze L, Albin A, Dallaglio K, Noonan DM, Mortara L. 2014.** Orchestration of angiogenesis by immune cells. *Frontiers in Oncology* **4**: 131.
- Bukczynski J, Wen T, Watts TH. 2003.** Costimulation of human CD28⁺ T cells by 4-1BB ligand. *European Journal of Immunology* **33**: 446–454.
- Burkholder B, Huang R-Y, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, Lv Z-Q, Gao C-Y, Wang B-L, Zhang Y-M, et al. 2014.** Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1845**: 182–201.
- Butler MO, Ansén S, Tanaka M, Imataki O, Berezovskaya A, Mooney MM, Metzler G, Milstein MI, Nadler LM, Hirano N. 2010.** A panel of human cell-based artificial APC enables the expansion of long-lived antigen-specific CD4⁺ T cells restricted by prevalent HLA-DR alleles. *International Immunology* **22**: 863–873.
- Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. 2007.** Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**: 111–122.
- Cai W, Zhou D, Wu W, Tan WL, Wang J, Zhou C, Lou Y. 2018.** MHC class II restricted neoantigen peptides predicted by clonal mutation analysis in lung adenocarcinoma patients: implications on prognostic immunological biomarker and vaccine design. *BMC genomics* **19**: 582.

- Campana S, De Pasquale C, Carrega P, Ferlazzo G, Bonaccorsi I. 2015.** Cross-dressing: an alternative mechanism for antigen presentation. *Immunology Letters* **168**: 349–354.
- Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH. 2001.** 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **167**: 1313–1324.
- Cao W, Ryan M, Buckley D, O'Connor R, Clarkson MR. 2011.** Tim-4 inhibition of T-cell activation and T helper type 17 differentiation requires both the immunoglobulin V and mucin domains and occurs via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Immunology* **133**: 179–189.
- Carrillo MA, Zhen A, Kitchen SG. 2018.** The Use of the Humanized Mouse Model in Gene Therapy and Immunotherapy for HIV and Cancer. *Frontiers in Immunology* **9**.
- Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. 2006.** Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**: 890–895.
- Cesson V, Rivals J-P, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, et al. 2011.** MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **60**: 23–35.
- Cha Z, Zang Y, Guo H, Rechlic JR, Olsanova LM, Gu H, Tu X, Song H, Qian B. 2013.** Association of peripheral CD4⁺ CXCR5⁺ T cells with chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **34**: 3579–3585.
- Chakravarti S, Sabatos CA, Xiao S, Illes Z, Cha EK, Sobel RA, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. 2005.** Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* **202**: 437–444.
- Chambers AF, Colella R, Denhardt DT, Wilson SM. 1992.** Increased expression of cathepsins L and B and decreased activity of their inhibitors in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Molecular Carcinogenesis* **5**: 238–245.
- Chapuis AG, Roberts IM, Thompson JA, Margolin KA, Bhatia S, Lee SM, Sloan HL, Lai IP, Farrar EA, Wagener F, et al. 2016.** T-Cell Therapy Using Interleukin-21-Primed Cytotoxic T-Cell Lymphocytes Combined With Cytotoxic T-Cell Lymphocyte Antigen-4 Blockade Results in Long-Term Cell Persistence and Durable Tumor Regression. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **34**: 3787–3795.
- Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. 2001.** Macrophage activation by armed CD4 TH1 cells. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*.
- Chen Q, Jackson H, Parente P, Luke T, Rizkalla M, Tai TY, Zhu H-C, Mifsud NA, Dimopoulos N, Masterman K-A, et al. 2004.** Immunodominant CD4⁺ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 9363–9368.

Chen TT, Li L, Chung D-H, Allen CDC, Torti SV, Torti FM, Cyster JG, Chen C-Y, Brodsky FM, Niemi EC, et al. 2005. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *The Journal of Experimental Medicine* **202**: 955–965.

Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. 2010. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4⁺ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology* **130**: 418–426.

Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, Strominger JL. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *The Journal of Experimental Medicine* **178**: 27–47.

Chiriva-Internati M, Grizzi F, Pinkston J, Morrow KJ, D’Cunha N, Frezza EE, Muzzio PC, Kast WM, Cobos E. 2006. Gamma-Radiation Upregulates MHC Class I/II and ICAM-I Molecules in Multiple Myeloma Cell Lines and Primary Tumors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* **42**: 89–95.

Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel M-R, Ghattas G, Brenchley JM, et al. 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine* **15**: 893–900.

Chornoguz O, Gapeev A, O’Neill MC, Ostrand-Rosenberg S. 2012. Major histocompatibility complex class II⁺ invariant chain negative breast cancer cells present unique peptides that activate tumor-specific T cells from breast cancer patients. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **11**: 1457–1467.

Clénet M-L, Gagnon F, Moratalla AC, Viel EC, Arbour N. 2017. Peripheral human CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. *Scientific Reports* **7**: 11612.

Collins M, Ling V, Carreno BM. 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biology* **6**: 223.

Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, Zhu J, Paul WE. 2004. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3880–3885.

Coulon P-G, Richetta C, Rouers A, Blanchet FP, Urrutia A, Guerbois M, Piguet V, Theodorou I, Bet A, Schwartz O, et al. 2016. HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II-Restricted Antigens to HIV-Specific CD4⁺ T Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **197**: 517–532.

Croft M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nature Reviews Immunology* **3**: 609–620.

Croft M. 2009. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature Reviews. Immunology* **9**: 271–285.

- Crosti M, Longhi R, Consogno G, Melloni G, Zannini P, Protti MP. 2006.** Identification of novel subdominant epitopes on the carcinoembryonic antigen recognized by CD4⁺ T cells of lung cancer patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **176**: 5093–5099.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, et al. 2004.** Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* **10**: 942–949.
- D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L, Alimandi M. 2018.** CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death & Disease* **9**: 282.
- Dani A, Chaudhry A, Mukherjee P, Rajagopal D, Bhatia S, George A, Bal V, Rath S, Mayor S. 2004.** The pathway for MHCII-mediated presentation of endogenous proteins involves peptide transport to the endo-lysosomal compartment. *Journal of Cell Science* **117**: 4219–4230.
- Davis DM. 2007.** Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nature Reviews. Immunology* **7**: 238–243.
- Dawicki W, Watts TH. 2004.** Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *European Journal of Immunology* **34**: 743–751.
- De Smet C, Lurquin C, van der Bruggen P, De Plaen E, Brasseur F, Boon T. 1994.** Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics* **39**: 121–129.
- De Smet C, Lurquin C, Lethé B, Martelange V, Boon T. 1999.** DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 7327–7335.
- Dejean AS, Beisner DR, Ch'en IL, Kerdiles YM, Babour A, Arden KC, Castrillon DH, DePinho RA, Hedrick SM. 2009.** Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nature Immunology* **10**: 504–513.
- Delong T, Wiles TA, Baker RL, Bradley B, Barbour G, Reisdorph R, Kumar N, Elso CM, Armstrong M, Powell RL, et al. 2016.** Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science (New York, N.Y.)* **351**: 711–714.
- Derdak SV, Kueng HJ, Leb VM, Neunkirchner A, Schmetterer KG, Bielek E, Majdic O, Knapp W, Seed B, Pickl WF. 2006.** Direct stimulation of T lymphocytes by immunosomes: virus-like particles decorated with T cell receptor/CD3 ligands plus costimulatory molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13144–13149.
- Desfrancois J, Derré L, Corvaisier M, Le Mével B, Catros V, Jotereau F, Gervois N. 2009.** Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 alphabeta T cells in human breast pleural effusions. *International Journal of Cancer* **125**: 374–380.
- Desfrancois J, Moreau-Aubry A, Vignard V, Godet Y, Khammari A, Dréno B, Jotereau F, Gervois N. 2010.** Double positive CD4CD8 alphabeta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PloS One* **5**: e8437.

- Dhainaut M, Moser M. 2014.** Regulation of immune reactivity by intercellular transfer. *Frontiers in Immunology* **5**: 112.
- Di Lullo G, Marcatti M, Heltai S, Brunetto E, Tresoldi C, Bondanza A, Bonini C, Ponzoni M, Tonon G, Ciceri F, et al. 2015.** Th22 cells increase in poor prognosis multiple myeloma and promote tumor cell growth and survival. *Oncoimmunology* **4**.
- Dice JF. 2007.** Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **3**: 295–299.
- Dolan BP, Gibbs KD, Ostrand-Rosenberg S. 2006a.** Tumor-specific CD4⁺ T cells are activated by ‘cross-dressed’ dendritic cells presenting peptide-MHC class II complexes acquired from cell-based cancer vaccines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **176**: 1447–1455.
- Dolan BP, Gibbs KD, Ostrand-Rosenberg S. 2006b.** Dendritic Cells Cross-Dressed with Peptide MHC Class I Complexes Prime CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* **177**: 6018–6024.
- Dominguez-Villar M, Hafler DA. 2018.** Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature Immunology* **19**: 665–673.
- Dong C, Temann UA, Flavell RA. 2001.** Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **166**: 3659–3662.
- Driessens G, Kline J, Gajewski TF. 2009.** Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunological Reviews* **229**: 126–144.
- Dubrot J, Duraes FV, Potin L, Capotosti F, Brighthouse D, Suter T, LeibundGut-Landmann S, Garbi N, Reith W, Swartz MA, et al. 2014.** Lymph node stromal cells acquire peptide–MHCI complexes from dendritic cells and induce antigen-specific CD4⁺ T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine* **211**: 1153–1166.
- Dudley ME, Rosenberg SA. 2003.** Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature Reviews. Cancer* **3**: 666–675.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004.** The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* **22**: 329–360.
- Dupont J, Latouche J-B, Ma C, Sadelain M. 2005.** Artificial antigen-presenting cells transduced with telomerase efficiently expand epitope-specific, human leukocyte antigen-restricted cytotoxic T cells. *Cancer Research* **65**: 5417–5427.
- Duraes FV, Niven J, Dubrot J, Hugues S, Gannagé M. 2015.** Macroautophagy in Endogenous Processing of Self- and Pathogen-Derived Antigens for MHC Class II Presentation. *Frontiers in Immunology* **6**: 459.
- Ebert A, Hill L, Busslinger M. 2015.** Spatial Regulation of V-(D)J Recombination at Antigen Receptor Loci. *Advances in Immunology* **128**: 93–121.
- Eisenlohr LC, Luckashenak N, Apcher S, Miller MA, Sinnathamby G. 2011.** Beyond the classical: influenza virus and the elucidation of alternative MHC class II-restricted antigen processing pathways. *Immunologic Research* **51**: 237–248.

- Elahi R, Khosh E, Tahmasebi S, Esmaeilzadeh A. 2018.** Immune Cell Hacking: Challenges and Clinical Approaches to Create Smarter Generations of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Frontiers in Immunology* **9**: 1717.
- ElKassar N, Gress RE. 2010.** An Overview of IL-7 Biology and Its Use in Immunotherapy. *Journal of immunotoxicology* **7**: 1–7.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, et al. 2009.** Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of Clinical Investigation* **119**: 3573–3585.
- Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. 2014.** Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews. Immunology* **14**: 24–35.
- Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, et al. 2006.** Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and Cellular Neurosciences* **31**: 642–648.
- Feng L-L, Gao J-M, Li P-P, Wang X. 2011.** IL-9 contributes to immunosuppression mediated by regulatory T cells and mast cells in B-cell non-hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Immunology* **31**: 1084–1094.
- Février B, Raposo G. 2004.** Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology* **16**: 415–421.
- Finn OJ. 2017.** Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow. *Cancer Immunology Research* **5**: 347–354.
- Fischer M, Bijman M, Molin D, Cormont F, Uyttenhove C, van Snick J, Sundström C, Enblad G, Nilsson G. 2003.** Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **17**: 2513–2516.
- Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schughart L, Schmidt CA, Andreesen R, Mackensen A. 2005.** Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta⁺ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* **105**: 2828–2835.
- Flynn JK, Paukovics G, Cashin K, Borm K, Ellett A, Roche M, Jakobsen MR, Churchill MJ, Gorry PR. 2014.** Quantifying susceptibility of CD4⁺ stem memory T-cells to infection by laboratory adapted and clinical HIV-1 strains. *Viruses* **6**: 709–726.
- Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, Goodall M, Lane P. 1998.** CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *The Journal of Experimental Medicine* **188**: 297–304.
- Fonteneau JF, Brilot F, Münz C, Gannagé M. 2016.** The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4⁺ T Cells after Intercellular Antigen Transfer. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **196**: 64–71.

- Fortin J-S, Cloutier M, Thibodeau J. 2013.** Exposing the Specific Roles of the Invariant Chain Isoforms in Shaping the MHC Class II Peptidome. *Frontiers in Immunology* **4**: 443.
- Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH. 2009.** PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* **206**: 3015–3029.
- Fujita H. 2013.** The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *Journal of Dermatological Science* **72**: 3–8.
- Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW. 2011.** Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **60**: 1419–1430.
- Gacerez AT, Sentman CL. 2018.** T-bet promotes potent antitumor activity of CD4 + CAR T cells. *Cancer Gene Therapy* **25**: 117–128.
- Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, Guo B, Herbert DR, Bulfone A, Trentini F, et al. 2013.** Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature Medicine* **19**: 739–746.
- Galaine J, Kellermann G, Guillaume Y, Boidot R, Picard E, Loyon R, Queiroz L, Boullerot L, Beziaud L, Jary M, et al. 2016.** Heparan Sulfate Proteoglycans Promote Telomerase Internalization and MHC Class II Presentation on Dendritic Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **197**: 1597–1608.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al. 2006.** Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, N.Y.)* **313**: 1960–1964.
- Galon J, Lugli A, Bifulco C, Pages F, Masucci G, Marincola FM, Ascierto PA. 2017.** World-Wide Immunoscore Task Force: meeting report from the ‘Melanoma Bridge’, Napoli, November 30th-December 3rd, 2016. *Journal of Translational Medicine* **15**: 212.
- Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, Gajewski TF, Ascierto PA. 2012.** The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *Journal of Translational Medicine* **10**: 1.
- Game DS, Rogers NJ, Lechler RI. 2005.** Acquisition of HLA-DR and Costimulatory Molecules by T Cells from Allogeneic Antigen Presenting Cells. *American Journal of Transplantation* **5**: 1614–1625.
- Gao X, Gigoux M, Yang J, Leconte J, Yang X, Suh W-K. 2012.** Anti-chlamydial Th17 responses are controlled by the inducible costimulator partially through phosphoinositide 3-kinase signaling. *PloS One* **7**: e52657.
- Garnier A, Hamieh M, Drouet A, Leprince J, Vivien D, Frébourg T, Le Mauff B, Latouche J-B, Toutirais O. 2016.** Artificial antigen presenting cells expressing HLA class II molecules as an effective tool for amplifying human specific memory CD4+ T cells. *Immunology and Cell Biology*.

- Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, et al. 2011.** A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine* **17**: 1290–1297.
- Gattinoni L, Restifo NP. 2013.** Moving T memory stem cells to the clinic. *Blood* **121**: 567–568.
- Gedde-Dahl T, Eriksen JA, Thorsby E, Gaudernack G. 1992.** T-cell responses against products of oncogenes: generation and characterization of human T-cell clones specific for p21 ras-derived synthetic peptides. *Human Immunology* **33**: 266–274.
- Gedde-Dahl T, Spurkland A, Fossum B, Wittinghofer A, Thorsby E, Gaudernack G. 1994.** T cell epitopes encompassing the mutational hot spot position 61 of p21 ras. Promiscuity in ras peptide binding to HLA. *European Journal of Immunology* **24**: 410–414.
- Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2003.** Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* **101**: 4260–4266.
- Geng J, Pogozheva ID, Mosberg HI, Raghavan M. 2015.** Use of Functional Polymorphisms To Elucidate the Peptide Binding Site of TAP Complexes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **195**: 3436–3448.
- Gerdes H-H, Carvalho RN. 2008.** Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Current Opinion in Cell Biology* **20**: 470–475.
- Gilardin L, Delignat S, Peyron I, Ing M, Lone Y-C, Gangadharan B, Michard B, Kherabi Y, Sharma M, Pashov A, et al. 2017.** The ADAMTS131239-1253 peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4⁺ T-cell epitope. *Haematologica* **102**: 1833–1841.
- God JM, Cameron C, Figueroa J, Amria S, Hossain A, Kempkes B, Bornkamm GW, Stuart RK, Blum JS, Haque A. 2015.** Elevation of c-MYC disrupts HLA class II-mediated immune recognition of human B cell tumors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **194**: 1434–1445.
- Granger SW, Rickert S. 2003.** LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **14**: 289–296.
- Gratz IK, Truong H-A, Yang SH-Y, Maurano MM, Lee K, Abbas AK, Rosenblum MD. 2013.** Cutting Edge: memory regulatory t cells require IL-7 and not IL-2 for their maintenance in peripheral tissues. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **190**: 4483–4487.
- Griffin JP, Chu R, Harding CV. 1997.** Early endosomes and a late endocytic compartment generate different peptide-class II MHC complexes via distinct processing mechanisms. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **158**: 1523–1532.
- Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, et al. 2002.** CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*. *Nature Immunology* **3**: 1097–1101.

- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, et al. 2013.** Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine* **368**: 1509–1518.
- Guedan S, Chen X, Madar A, Carpenito C, McGettigan SE, Frigault MJ, Lee J, Posey AD, Scholler J, Scholler N, et al. 2014.** ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood* **124**: 1070–1080.
- Guéry L, Hugues S. 2015.** Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Research International* **2015**: 314620.
- Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, Ravoet M, Le Buanec H, Sibille C, Manfouo-Foutsop G, et al. 2013.** CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of Clinical Investigation* **123**: 2873–2892.
- Hamza E, Akdis CA, Wagner B, Steinbach F, Marti E. 2013.** In vitro induction of functional allergen-specific CD4⁺ CD25^{high} Treg cells in horses affected with insect bite hypersensitivity. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **43**: 889–901.
- Hanada K-I, Yewdell JW, Yang JC. 2004.** Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* **427**: 252–256.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–674.
- Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. 2001.** Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **166**: 3717–3723.
- Hasan AN, Kollen WJ, Trivedi D, Selvakumar A, Dupont B, Sadelain M, O'Reilly RJ. 2009.** A panel of artificial APCs expressing prevalent HLA alleles permits generation of cytotoxic T cells specific for both dominant and subdominant viral epitopes for adoptive therapy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **183**: 2837–2850.
- Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. 2004.** A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **173**: 4828–4837.
- Hintzen RQ, Lens SM, Lammers K, Kuiper H, Beckmann MP, van Lier RA. 1995.** Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **154**: 2612–2623.
- Holland CJ, Rizkallah PJ, Vollers S, Calvo-Calle JM, Madura F, Fuller A, Sewell AK, Stern LJ, Godkin A, Cole DK. 2012.** Minimal conformational plasticity enables TCR cross-reactivity to different MHC class II heterodimers. *Scientific Reports* **2**: 629.
- Hong C-H, Sohn H-J, Lee H-J, Cho H-I, Kim T-G. 2017.** Antigen Presentation by Individually Transferred HLA Class I Genes in HLA-A, HLA-B, HLA-C Null Human Cell Line Generated Using the Multiplex CRISPR-Cas9 System. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* **40**: 201–210.

- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003.** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)* **299**: 1057–1061.
- Hu Z, Ott PA, Wu CJ. 2018.** Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nature Reviews. Immunology* **18**: 168–182.
- Huang Y-H, Cao Y-F, Jiang Z-Y, Zhang S, Gao F. 2015.** Th22 cell accumulation is associated with colorectal cancer development. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **21**: 4216–4224.
- Huang J, El-Gamil M, Dudley ME, Li YF, Rosenberg SA, Robbins PF. 2004.** T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **172**: 6057–6064.
- Huang J, Wang QJ, Yang S, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA, Robbins PF. 2011.** Irradiation enhances human T cell function by up-regulating CD70 expression on antigen-presenting cells in vitro. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **34**: 327–335.
- Humphries C. 2013.** Adoptive cell therapy: Honing that killer instinct. *Nature* **504**: S13-15.
- Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnajatic S, Thompson JA, Yee C. 2008.** Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4⁺ T cells against NY-ESO-1. *The New England Journal of Medicine* **358**: 2698–2703.
- Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS. 1997.** Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **158**: 2600–2609.
- Hwang I, Huang JF, Kishimoto H, Brunmark A, Peterson PA, Jackson MR, Surh CD, Cai Z, Sprent J. 2000.** T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells. *The Journal of Experimental Medicine* **191**: 1137–1148.
- Imaizumi T, Kumagai M, Sasaki N, Kurotaki H, Mori F, Seki M, Nishi N, Fujimoto K, Tanji K, Shibata T, et al. 2002.** Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology* **72**: 486–491.
- Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. 2016.** Driving CAR T-cells forward. *Nature Reviews. Clinical Oncology* **13**: 370–383.
- Jiang Y, Arase N, Kohyama M, Hirayasu K, Suenaga T, Jin H, Matsumoto M, Shida K, Lanier LL, Saito T, et al. 2013.** Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *International Immunology* **25**: 235–246.
- June CH. 2007.** Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *Journal of Clinical Investigation* **117**: 1466–1476.
- Juno JA, van Bockel D, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders JJ, Munier CML. 2017.** Cytotoxic CD4 T Cells—Friend or Foe during Viral Infection? *Frontiers in Immunology* **8**.

- Kaech SM, Cui W. 2012.** Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nature Reviews. Immunology* **12**: 749–761.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. 2002.** Vaccines: Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* **2**: 251–262.
- Kahn M, Sugawara H, McGowan P, Okuno K, Nagoya S, Hellström KE, Hellström I, Greenberg P. 1991.** CD4⁺ T cell clones specific for the human p97 melanoma-associated antigen can eradicate pulmonary metastases from a murine tumor expressing the p97 antigen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **146**: 3235–3241.
- Kämper N, Franken S, Temme S, Koch S, Bieber T, Koch N. 2012.** γ -Interferon-regulated chaperone governs human lymphocyte antigen class II expression. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**: 104–116.
- Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. 2015.** The Development and in vivo function of TH9 cells. *Nature reviews. Immunology* **15**: 295–307.
- Kawamura T, Ogawa Y, Shimozato O, Ando T, Nakao A, Kobata T, Okumura K, Yagita H, Shimada S. 2011.** CD70 is selectively expressed on Th1 but not on Th2 cells and is required for Th1-type immune responses. *The Journal of Investigative Dermatology* **131**: 1252–1261.
- Kayser S, Boß C, Feucht J, Witte K-E, Scheu A, Bülow H-J, Joachim S, Stevanović S, Schumm M, Rittig SM, et al. 2015.** Rapid generation of NY-ESO-1-specific CD4⁺ THELPER1 cells for adoptive T-cell therapy. *Oncoimmunology* **4**: e1002723.
- Kennedy R, Celis E. 2008.** Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological Reviews* **222**: 129–144.
- Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, Johnson KL, Gonzalez DG, Kleinstein SH, Haberman AM. 2011.** Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* **34**: 947–960.
- Khodadoust MS, Olsson N, Wagar LE, Haabeth OAW, Chen B, Swaminathan K, Rawson K, Liu CL, Steiner D, Lund P, et al. 2017.** Antigen presentation profiling reveals recognition of lymphoma immunoglobulin neoantigens. *Nature* **543**: 723–727.
- Kim KH, Greenfield WW, Cannon MJ, Coleman HN, Spencer HJ, Nakagawa M. 2012.** CD4⁺ T-cell response against human papillomavirus type 16 E6 protein is associated with a favorable clinical trend. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **61**: 63–70.
- Kim A, Hartman IZ, Poore B, Boronina T, Cole RN, Song N, Ciudad MT, Caspi RR, Jaraquemada D, Sadegh-Nasseri S. 2014.** Divergent paths for the selection of immunodominant epitopes from distinct antigenic sources. *Nature Communications* **5**: 5369.
- Kim YJ, Kim SH, Mantel P, Kwon BS. 1998.** Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *European Journal of Immunology* **28**: 881–890.
- Kim JV, Latouche J-B, Rivière I, Sadelain M. 2004.** The ABCs of artificial antigen presentation. *Nature Biotechnology* **22**: 403–410.

- Kitano S, Tsuji T, Liu C, Hirschhorn-Cymerman D, Kyi C, Mu Z, Allison JP, Gnjjatic S, Yuan JD, Wolchok JD. 2013.** Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients. *Cancer immunology research* 1.
- Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, Palmer DC, Antony PA, Hwang ST, Rosenberg SA, et al. 2005.** Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9571–9576.
- Klebanoff CA, Scott CD, Leonardi AJ, Yamamoto TN, Cruz AC, Ouyang C, Ramaswamy M, Roychoudhuri R, Ji Y, Eil RL, et al. 2016.** Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *The Journal of Clinical Investigation* 126: 318–334.
- Kobayashi N, Karisola P, Peña-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, Butte MJ, Nagumo H, Chernova I, Zhu B, et al. 2007.** TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27: 927–940.
- Kobayashi H, Song Y, Hoon DS, Appella E, Celis E. 2001.** Tumor-reactive T helper lymphocytes recognize a promiscuous MAGE-A3 epitope presented by various major histocompatibility complex class II alleles. *Cancer Research* 61: 4773–4778.
- Kochenderfer JN, Rosenberg SA. 2013.** Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10: 267–276.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009.** IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology* 27: 485–517.
- Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, Boegel S, Schrörs B, Vascotto F, Castle JC, et al. 2015.** Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520: 692–696.
- Krishnadas DK, Bai F, Lucas KG. 2013.** Cancer testis antigen and immunotherapy. *ImmunoTargets and Therapy* 2: 11–19.
- Kroemer A, Xiao X, Vu MD, Gao W, Minamimura K, Chen M, Maki T, Li XC. 2007.** OX40 controls functionally different T cell subsets and their resistance to depletion therapy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179: 5584–5591.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, et al. 2009.** Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114: 1141–1149.
- Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. 1995.** B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80: 707–718.

- Kumanogoh A, Marukawa S, Suzuki K, Takegahara N, Watanabe C, Ch'ng E, Ishida I, Fujimura H, Sakoda S, Yoshida K, et al. 2002.** Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* **419**: 629–633.
- Kyte JA. 2009.** Cancer vaccination with telomerase peptide GV1001. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **18**: 687–694.
- Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. 2016.** The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nature Reviews. Immunology* **16**: 102–111.
- Lam TH, Mamitsuka H, Ren EC, Tong JC. 2010.** TAP Hunter: a SVM-based system for predicting TAP ligands using local description of amino acid sequence. *Immunome Research* **6 Suppl 1**: S6.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. 2002.** Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nature Reviews. Immunology* **2**: 982–987.
- Latouche JB, Sadelain M. 2000.** Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nature Biotechnology* **18**: 405–409.
- Laydon DJ, Bangham CRM, Asquith B. 2015.** Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**.
- Leão R, Apolónio JD, Lee D, Figueiredo A, Tabori U, Castelo-Branco P. 2018.** Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *Journal of Biomedical Science* **25**.
- Lechler R, Aichinger G, Lightstone L. 1996.** The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews* **151**: 51–79.
- Lenz DC, Kurz SK, Lemmens E, Schoenberger SP, Sprent J, Oldstone MBA, Homann D. 2004.** IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9357–9362.
- Leone DA, Rees AJ, Kain R. 2018.** Dendritic cells and routing cargo into exosomes. *Immunology and Cell Biology* **96**: 683–693.
- Leung CSK. 2015.** Endogenous Antigen Presentation of MHC Class II Epitopes through Non-Autophagic Pathways. *Frontiers in Immunology* **6**: 464.
- Leung CS, Haigh TA, Mackay LK, Rickinson AB, Taylor GS. 2010.** Nuclear location of an endogenously expressed antigen, EBNA1, restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2165–2170.
- Levine BL, Bernstein WB, Aronson NE, Schlienger K, Cotte J, Perfetto S, Humphries MJ, Ratto-Kim S, Birx DL, Steffens C, et al. 2002.** Adoptive transfer of costimulated CD4+ T cells induces expansion of peripheral T cells and decreased CCR5 expression in HIV infection. *Nature Medicine* **8**: 47–53.

- Levine BL, Cotte J, Small CC, Carroll RG, Riley JL, Bernstein WB, Van Epps DE, Hardwick RA, June CH. 1998.** Large-scale production of CD4⁺ T cells from HIV-1-infected donors after CD3/CD28 costimulation. *Journal of Hematotherapy* 7: 437–448.
- Li J, Huston G, Swain SL. 2003.** IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 1807–1815.
- Li Z, Jiang J, Wang Z, Zhang J, Xiao M, Wang C, Lu Y, Qin Z. 2008.** Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer Research* 68: 8687–8694.
- Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, et al. 2008.** Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180: 5916–5926.
- Liao W, Lin J-X, Wang L, Li P, Leonard WJ. 2011.** Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nature Immunology* 12: 551–559.
- Liao W, Schones DE, Oh J, Cui Y, Cui K, Roh T-Y, Zhao K, Leonard WJ. 2008.** Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nature Immunology* 9: 1288–1296.
- Liepe J, Marino F, Sidney J, Jeko A, Bunting DE, Sette A, Klotzel PM, Stumpf MPH, Heck AJR, Mishto M. 2016.** A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science (New York, N.Y.)* 354: 354–358.
- Liepe J, Ovaa H, Mishto M. 2018.** Why do proteases mess up with antigen presentation by re-shuffling antigen sequences? *Current Opinion in Immunology* 52: 81–86.
- Lim WA, June CH. 2017.** The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* 168: 724–740.
- de Lima Lopes G, Nahas GR. 2018.** Chimeric antigen receptor T cells, a savior with a high price. *Chinese Clinical Oncology* 7: 21.
- Lin L, Couturier J, Yu X, Medina MA, Kozinetz CA, Lewis DE. 2014.** Granzyme B secretion by human memory CD4 T cells is less strictly regulated compared to memory CD8 T cells. *BMC immunology* 15: 36.
- Lin Y, Gallardo HF, Ku GY, Li H, Manukian G, Rasalan TS, Xu Y, Terzulli SL, Old LJ, Allison JP, et al. 2009.** Optimization and validation of a robust human T cell culture method for monitoring phenotypic and polyfunctional antigen-specific CD4 and CD8 T-cell responses. *Cytotherapy* 11: 912–922.
- Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TIM. 2005.** Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92–99.

- Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, von Knebel Doeberitz M. 2001.** Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *International Journal of Cancer* **93**: 6–11.
- Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, Verdegaal EME, Schotte R, Calis JJA, Behjati S, Velds A, Hilkmann H, Atmioui DE, et al. 2015.** High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4⁺ T cells in human melanoma. *Nature Medicine* **21**: 81–85.
- Liu Y, Gu Y, Cao X. 2015.** The exosomes in tumor immunity. *Oncoimmunology* **4**: e1027472.
- Liu T, He S-H, Zheng P-Y, Zhang T-Y, Wang B-Q, Yang P-C. 2007.** Staphylococcal enterotoxin B increases TIM4 expression in human dendritic cells that drives naïve CD4 T cells to differentiate into Th2 cells. *Molecular Immunology* **44**: 3580–3587.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, et al. 2006.** CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine* **203**: 1701–1711.
- Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, et al. 2011.** Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* **118**: 6050–6056.
- Lu Y-C, Parker LL, Lu T, Zheng Z, Toomey MA, White DE, Yao X, Li YF, Robbins PF, Feldman SA, et al. 2017.** Treatment of Patients With Metastatic Cancer Using a Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted T-Cell Receptor Targeting the Cancer Germline Antigen MAGE-A3. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*: JCO2017745463.
- Lu Y, Wang Q, Xue G, Bi E, Ma X, Wang A, Qian J, Dong C, Yi Q. 2018.** Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4⁺ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* **33**: 1048-1060.e7.
- Lu Y, Yi Q. 2013.** Utilizing TH9 cells as a novel therapeutic strategy for malignancies. *Oncoimmunology* **2**: e23084.
- Luckey CJ, Weaver CT. 2012.** Stem-cell-like qualities of immune memory; CD4⁺ T cells join the party. *Cell Stem Cell* **10**: 107–108.
- Lugli E, Dominguez MH, Gattinoni L, Chattopadhyay PK, Bolton DL, Song K, Klatt NR, Brenchley JM, Vaccari M, Gostick E, et al. 2013.** Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *The Journal of Clinical Investigation* **123**: 594–599.
- Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, Angell HK, Fredriksen T, Elie N, Fauquemberg E, et al. 2015.** Correlation between Density of CD8⁺ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Research* **75**: 3446–3455.

- Magee CN, Boenisch O, Najafian N. 2012.** The role of costimulatory molecules in directing the functional differentiation of alloreactive T helper cells. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **12**: 2588–2600.
- Maity B, Sheff D, Fisher RA. 2013.** Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments. *Methods in Cell Biology* **113**: 81–105.
- Mak TW, Saunders ME, Jett BD (Eds.). 2014.** Chapter 6 - The Major Histocompatibility Complex. In: *Primer to the Immune Response (Second Edition)*. Boston: Academic Cell, 143–159.
- Malek TR. 2008.** The biology of interleukin-2. *Annual Review of Immunology* **26**: 453–479.
- Mandic M, Castelli F, Janjic B, Almunia C, Andrade P, Gillet D, Brusic V, Kirkwood JM, Maillere B, Zarour HM. 2005.** One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4⁺ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **174**: 1751–1759.
- Mannering SI, So M, Elso CM, Kay TWH. 2018.** Shuffling peptides to create T-cell epitopes: does the immune system play cards? *Immunology and Cell Biology* **96**: 34–40.
- Marks-Konczalik J, Dubois S, Losi JM, Sabzevari H, Yamada N, Feigenbaum L, Waldmann TA, Tagaya Y. 2000.** IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11445–11450.
- Marshall NB, Swain SL. 2011.** Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* **2011**: 954602.
- Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F. 2012.** Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- β -dependent immunosuppressive activity? *Trends in Molecular Medicine* **18**: 742–749.
- Martina MN, Noel S, Saxena A, Rabb H, Hamad ARA. 2015.** Double negative (DN) $\alpha\beta$ T cells: misperception and overdue recognition. *Immunology and Cell Biology* **93**: 305–310.
- Martorelli D, Muraro E, Merlo A, Turrini R, Rosato A, Dolcetti R. 2010.** Role of CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes in the control of viral diseases and cancer. *International Reviews of Immunology* **29**: 371–402.
- Matsuzaki J, Tsuji T, Luescher I, Old LJ, Shrikant P, Gnjjatic S, Odunsi K. 2014.** Nonclassical antigen-processing pathways are required for MHC class II-restricted direct tumor recognition by NY-ESO-1-specific CD4⁽⁺⁾ T cells. *Cancer Immunology Research* **2**: 341–350.
- Maus MV, Riley JL, Kwok WW, Nepom GT, June CH. 2003.** HLA tetramer-based artificial antigen-presenting cells for stimulation of CD4⁺ T cells. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* **106**: 16–22.
- Maus MV, Thomas AK, Leonard DGB, Allman D, Addya K, Schlienger K, Riley JL, June CH. 2002.** Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T

lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nature Biotechnology* **20**: 143–148.

Mayes PA, Hance KW, Hoos A. 2018. The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery* **17**: 509–527.

Mazzucchelli R, Durum SK. 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature Reviews. Immunology* **7**: 144–154.

Meng X, Yang J, Dong M, Zhang K, Tu E, Gao Q, Chen W, Zhang C, Zhang Y. 2016. Regulatory T cells in cardiovascular diseases. *Nature Reviews. Cardiology* **13**: 167–179.

Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. 2003. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nature Immunology* **4**: 78–86.

Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, Kenny J, Zheng XX, Umetsu DT, DeKruyff RH, et al. 2005. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nature Immunology* **6**: 455–464.

Michaux A, Larrieu P, Stroobant V, Fonteneau J-F, Jotereau F, Van den Eynde BJ, Moreau-Aubry A, Vigneron N. 2014. A spliced antigenic peptide comprising a single spliced amino acid is produced in the proteasome by reverse splicing of a longer peptide fragment followed by trimming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **192**: 1962–1971.

Miller MA, Ganesan APV, Luckashenak N, Mendonca M, Eisenlohr LC. 2015. Endogenous antigen processing drives the primary CD4⁺ T cell response to influenza. *Nature Medicine* **21**: 1216–1222.

Mimura Y, Mimura-Kimura Y, Doores K, Golgher D, Davis BG, Dwek RA, Rudd PM, Elliott T. 2007. Folding of an MHC class II-restricted tumor antigen controls its antigenicity via MHC-guided processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 5983–5988.

Mishto M, Liepe J. 2017. Post-Translational Peptide Splicing and T Cell Responses. *Trends in Immunology* **38**: 904–915.

Miyake K, Shiozawa N, Nagao T, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Karasuyama H. 2017. Trogocytosis of peptide-MHC class II complexes from dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: 1111–1116.

Mizote Y, Taniguchi T, Tanaka K, Isobe M, Wada H, Saika T, Kita S, Koide Y, Uenaka A, Nakayama E. 2010. Three novel NY-ESO-1 epitopes bound to DRB1*0803, DQB1*0401 and DRB1*0901 recognized by CD4⁺ T cells from CHP-NY-ESO-1-vaccinated patients. *Vaccine* **28**: 5338–5346.

Montaser M, Lalmanach G, Mach L. 2002. CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biological Chemistry* **383**: 1305–1308.

- Mortara L, Frangione V, Castellani P, De Lerma Barbaro A, Accolla RS. 2009.** Irradiated CIITA-positive mammary adenocarcinoma cells act as a potent anti-tumor-preventive vaccine by inducing tumor-specific CD4⁺ T cell priming and CD8⁺ T cell effector functions. *International Immunology* **21**: 655–665.
- Mucida D, Husain MM, Muroi S, van Wijk F, Shinnakasu R, Naoe Y, Reis BS, Huang Y, Lambolez F, Docherty M, et al. 2013.** Transcriptional reprogramming of mature CD4⁺ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nature Immunology* **14**: 281–289.
- Mullinax JE, Hall M, Prabhakaran S, Weber J, Khushalani N, Eroglu Z, Brohl AS, Markowitz J, Royster E, Richards A, et al. 2018.** Combination of Ipilimumab and Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients with Metastatic Melanoma. *Frontiers in Oncology* **8**.
- Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, Sukumar M, Reger RN, Yu Z, Kern SJ, et al. 2011.** Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity* **35**: 972–985.
- Muranski P, Restifo NP. 2013.** Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**: 2402–2414.
- Nakayama M. 2015.** Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells. *Frontiers in Immunology* **5**.
- Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. 2011.** Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 18360–18365.
- Nascimbeni M, Pol S, Saunier B. 2011.** Distinct CD4⁺ CD8⁺ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PloS One* **6**: e20145.
- Nascimbeni M, Shin E-C, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehmann B. 2004.** Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* **104**: 478–486.
- Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. 2011.** Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews. Immunology* **11**: 823–836.
- Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, Komanduri KV, Lin Y, Jain N, Daver N, et al. 2018.** Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nature Reviews. Clinical Oncology* **15**: 47–62.
- Nishimura Y, Chen Y-Z, Uemura Y, Tanaka Y, Tsukamoto H, Kanai T, Yokomizo H, Yun C, Matsuoka T, Irie A, et al. 2004.** Degenerate recognition and response of human CD4⁺ Th cell clones: implications for basic and applied immunology. *Molecular Immunology* **40**: 1089–1094.

- van Nispen tot Pannerden HE, Geerts WJ, Kleijmeer MJ, Heijnen HFG. 2010.** Spatial organization of the transforming MHC class II compartment. *Biology of the Cell* **102**: 581–591.
- Oh S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA, Berzofsky JA. 2008.** IL-15 as a mediator of CD4⁺ help for CD8⁺ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 5201–5206.
- Oh J, Shin J-S. 2015.** Molecular mechanism and cellular function of MHCII ubiquitination. *Immunological reviews* **266**: 134–144.
- Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, Hermann P, Delespesse G. 1998.** OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* **92**: 3338–3345.
- Oliveira G, Ruggiero E, Stanghellini MTL, Cieri N, D’Agostino M, D’Agostino M, Fronza R, Lulay C, Dionisio F, Mastaglio S, et al. 2015.** Tracking genetically engineered lymphocytes long-term reveals the dynamics of T cell immunological memory. *Science Translational Medicine* **7**: 317ra198.
- van Oosterwijk MF, Juwana H, Arens R, Tesselaar K, van Oers MHJ, Eldering E, van Lier RAW. 2007.** CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4⁺ T cells for IL-12-induced Th1 cell development. *International Immunology* **19**: 713–718.
- Ouyang W, Beckett O, Flavell RA, Li MO. 2009.** An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* **30**: 358–371.
- Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F-S, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, et al. 2018.** International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet (London, England)* **391**: 2128–2139.
- Paludan C, Bickham K, Nikiforow S, Tsang ML, Goodman K, Hanekom WA, Fonteneau J-F, Stevanović S, Münz C. 2002.** Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt’s lymphoma cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **169**: 1593–1603.
- Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, Münz C. 2005.** Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science (New York, N.Y.)* **307**: 593–596.
- Papanicolaou GA, Latouche J-B, Tan C, Dupont J, Stiles J, Pamer EG, Sadelain M. 2003.** Rapid expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells expressing a single HLA allele. *Blood* **102**: 2498–2505.
- Parrot T, Oger R, Benlalam H, Raingeard de la Blétière D, Jouand N, Coutolleau A, Preisser L, Khammari A, Dréno B, Guardiola P, et al. 2016.** CD40L confers helper functions to human intra-melanoma class-I-restricted CD4⁺CD8⁺ double positive T cells. *Oncoimmunology* **5**: e1250991.

- Patel DM, Arnold PY, White GA, Nardella JP, Mannie MD. 1999.** Class II MHC/peptide complexes are released from APC and are acquired by T cell responders during specific antigen recognition. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **163**: 5201–5210.
- Pathak SS, Lich JD, Blum JS. 2001.** Cutting edge: editing of recycling class II:peptide complexes by HLA-DM. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **167**: 632–635.
- Pepper M, Jenkins MK. 2011.** Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nature Immunology* **12**: 467–471.
- Perkins D, Wang Z, Donovan C, He H, Mark D, Guan G, Wang Y, Walunas T, Bluestone J, Listman J, et al. 1996.** Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **156**: 4154–4159.
- Pinet V, Vergelli M, Martin R, Bakke O, Long EO. 1995.** Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* **375**: 603–606.
- Pitt JM, André F, Amigorena S, Soria J-C, Eggermont A, Kroemer G, Zitvogel L. 2016.** Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation* **126**: 1224–1232.
- Platteel ACM, Liepe J, van Eden W, Mishto M, Sijts AJAM. 2017a.** An Unexpected Major Role for Proteasome-Catalyzed Peptide Splicing in Generation of T Cell Epitopes: Is There Relevance for Vaccine Development? *Frontiers in Immunology* **8**: 1441.
- Platteel ACM, Liepe J, Textoris-Taube K, Keller C, Henklein P, Schalkwijk HH, Cardoso R, Kloetzel PM, Mishto M, Sijts AJAM. 2017b.** Multi-level Strategy for Identifying Proteasome-Catalyzed Spliced Epitopes Targeted by CD8+ T Cells during Bacterial Infection. *Cell Reports* **20**: 1242–1253.
- Platteel ACM, Mishto M, Textoris-Taube K, Keller C, Liepe J, Busch DH, Kloetzel PM, Sijts AJAM. 2016.** CD8(+) T cells of *Listeria monocytogenes*-infected mice recognize both linear and spliced proteasome products. *European Journal of Immunology* **46**: 1109–1118.
- Prakken B, Wauben M, Genini D, Samodal R, Barnett J, Mendivil A, Leoni L, Albani S. 2000.** Artificial antigen-presenting cells as a tool to exploit the immune ‘synapse’. *Nature Medicine* **6**: 1406–1410.
- Pulliam SR, Uzhachenko RV, Adunyah SE, Shanker A. 2016.** Common gamma chain cytokines in combinatorial immune strategies against cancer. *Immunology Letters* **169**: 61–72.
- Purton JF, Tan JT, Rubinstein MP, Kim DM, Sprent J, Surh CD. 2007.** Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *The Journal of Experimental Medicine* **204**: 951–961.
- Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, Jetten AM, Khoury SJ, Fuhlbrigge RC, Kuchroo VK, et al. 2012.** Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nature Medicine* **18**: 1248–1253.
- Qin S, Ma S, Huang X, Lu D, Zhou Y, Jiang H. 2014.** Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression. *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu* **26**: 135–141.

- Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA, et al. 2010.** Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of Experimental Medicine* **207**: 637–650.
- Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, et al. 2011.** Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)* **332**: 600–603.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. 1999.** SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**: 213–219.
- Rangan L, Galaine J, Boidot R, Hamieh M, Dosset M, Francoual J, Beziaud L, Pallandre J-R, Lauret Marie Joseph E, Asgarova A, et al. 2017.** Identification of a novel PD-L1 positive solid tumor transplantable in HLA-A*0201/DRB1*0101 transgenic mice. *Oncotarget* **8**: 48959–48971.
- Rechavi O, Goldstein I, Kloog Y. 2009.** Intercellular exchange of proteins: the immune cell habit of sharing. *FEBS letters* **583**: 1792–1799.
- Redpath SA, van der Werf N, Cervera AM, MacDonald AS, Gray D, Maizels RM, Taylor MD. 2013.** ICOS controls Foxp3(+) regulatory T-cell expansion, maintenance and IL-10 production during helminth infection. *European Journal of Immunology* **43**: 705–715.
- Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. 1998.** Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* **8**: 615–623.
- Reid PA, Watts C. 1990.** Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* **346**: 655–657.
- Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M. 2005.** Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Reviews. Immunology* **5**: 793–806.
- Renauld JC, van der Lugt N, Vink A, van Roon M, Godfraind C, Warnier G, Merz H, Feller A, Berns A, Van Snick J. 1994.** Thymic lymphomas in interleukin 9 transgenic mice. *Oncogene* **9**: 1327–1332.
- Restifo NP. 2014.** Big bang theory of stem-like T cells confirmed. *Blood* **124**: 476–477.
- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. 2012.** Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews. Immunology* **12**: 269–281.
- Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P. 1992.** HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* **360**: 474–477.
- Rickert M, Wang X, Boulanger MJ, Goriatcheva N, Garcia KC. 2005.** The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science (New York, N.Y.)* **308**: 1477–1480.
- Riley JL. 2009.** PD-1 signaling in primary T cells. *Immunological reviews* **229**: 114–125.

- del Rio ML, Lucas CL, Buhler L, Rayat G, Rodriguez-Barbosa JI. 2010.** HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. *Journal of Leukocyte Biology* **87**: 223–235.
- Riou C, Yassine-Diab B, Van grevenynghe J, Somogyi R, Greller LD, Gagnon D, Gimmig S, Wilkinson P, Shi Y, Cameron MJ, et al. 2007.** Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4⁺ central memory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* **204**: 79–91.
- Rivera Vargas T, Humblin E, Végran F, Ghiringhelli F, Apetoh L. 2017.** TH9 cells in anti-tumor immunity. *Seminars in Immunopathology* **39**: 39–46.
- Roche PA, Furuta K. 2015.** The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews. Immunology* **15**: 203–216.
- Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. 2009.** New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines. *Nature reviews. Immunology* **9**: 480.
- Roda-Navarro P, Reyburn HT. 2007.** Intercellular protein transfer at the NK cell immune synapse: mechanisms and physiological significance. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**: 1636–1646.
- Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, Umetsu DT. 2009.** The costimulatory role of TIM molecules. *Immunological reviews* **229**: 259–270.
- Rogel A, Vignard V, Bobinet M, Labarriere N, Lang F. 2011.** A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **60**: 327–337.
- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA. 1988.** Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *The New England Journal of Medicine* **319**: 1676–1680.
- Rossignol A, Bonnaudet V, Clémenceau B, Vié H, Bretaudeau L. 2017.** A high-performance, non-radioactive potency assay for measuring cytotoxicity: A full substitute of the chromium-release assay targeting the regulatory-compliance objective. *mAbs* **9**: 521–535.
- Rottman JB, Smith T, Tonra JR, Ganley K, Bloom T, Silva R, Pierce B, Gutierrez-Ramos JC, Ozkaynak E, Coyle AJ. 2001.** The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature Immunology* **2**: 605–611.
- Rudensky AY, null, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA. 1991.** Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**: 622–627.
- Russo V, Zhou D, Sartirana C, Rovere P, Villa A, Rossini S, Traversari C, Bordignon C. 2000.** Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood* **95**: 3473–3477.
- Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A, Sánchez-Fueyo A, Zheng XX, Coyle AJ, Strom TB, Freeman GJ, Kuchroo VK. 2003.** Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand

regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nature Immunology* **4**: 1102–1110.

Sadegh-Nasseri S. 2016. A step-by-step overview of the dynamic process of epitope selection by major histocompatibility complex class II for presentation to helper T cells. *F1000Research* **5**.

Sadelain M. 2015. CAR therapy: the CD19 paradigm. *The Journal of Clinical Investigation* **125**: 3392–3400.

Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. 2013. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery* **3**: 388–398.

Sadelain M, Rivière I, Brentjens R. 2003. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nature Reviews. Cancer* **3**: 35–45.

Sadelain M, Rivière I, Riddell S. 2017. Therapeutic T cell engineering. *Nature* **545**: 423–431.

Sæterdal I, Bjørheim J, Lislud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, Nesland JM, Eriksen JA, Møller M, Lindblom A, et al. 2001. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13255–13260.

Sage PT, Sharpe AH. 2016. T follicular regulatory cells. *Immunological Reviews* **271**: 246–259.

Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L. 2011. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental Cell* **20**: 131–139.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **155**: 1151–1164.

Salama P, Phillips M, Griew F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B. 2009. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 186–192.

Salek-Ardakani S, Song J, Halteman BS, Jember AG-H, Akiba H, Yagita H, Croft M. 2003. OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* **198**: 315–324.

Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**: 708–712.

Salmikangas P, Kinsella N, Chamberlain P. 2018. Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CAR T-Cells) for Cancer Immunotherapy – Moving Target for Industry? *Pharmaceutical Research* **35**.

- Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, Manlongat N, Bender O, Kamradt T, Kuchroo VK, et al. 2003.** Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nature Immunology* **4**: 1093–1101.
- Sarrabayrouse G, Corvaisier M, Ouisse L-H, Bossard C, Le Mével B, Potiron L, Meurette G, Gervois N, Jotereau F. 2011.** Tumor-reactive CD4⁺ CD8 $\alpha\beta$ ⁺ CD103⁺ $\alpha\beta$ T cells: a prevalent tumor-reactive T-cell subset in metastatic colorectal cancers. *International Journal of Cancer* **128**: 2923–2932.
- Schenkel JM, Masopust D. 2014.** Tissue-resident memory T cells. *Immunity* **41**: 886–897.
- Schiller C, Huber JE, Diakopoulos KN, Weiss EH. 2013.** Tunneling nanotubes enable intercellular transfer of MHC class I molecules. *Human Immunology* **74**: 412–416.
- Schluns KS, Lefrançois L. 2003.** Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews. Immunology* **3**: 269–279.
- Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen S-Y. 2002.** Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4⁺ T-helper cells. *Cancer Research* **62**: 2600–2605.
- Schroers R, Shen L, Rollins L, Rooney CM, Slawin K, Sonderstrup G, Huang XF, Chen S-Y. 2003a.** Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 4743–4755.
- Schroers R, Shen L, Rollins L, Xiao Z, Sonderstrup G, Slawin K, Huang XF, Chen S-Y. 2003b.** Identification of MHC class II-restricted T-cell epitopes in prostate-specific membrane antigen. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 3260–3271.
- Schultz HS, Reedtz-Runge SL, Bäckström BT, Lamberth K, Pedersen CR, Kvarnhammar AM, Consortium on behalf of the A. 2017.** Quantitative analysis of the CD4⁺ T cell response to therapeutic antibodies in healthy donors using a novel T cell:PBMC assay. *PLOS ONE* **12**: e0178544.
- Schultz ES, Schuler-Thurner B, Stroobant V, Jenne L, Berger TG, Thielemanns K, van der Bruggen P, Schuler G. 2004.** Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell-based immunotherapy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **172**: 1304–1310.
- Schumacher T, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, Menn O, Osswald M, Oezen I, Ott M, et al. 2014.** A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* **512**: 324–327.
- Schumacher TN, Schreiber RD. 2015.** Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)* **348**: 69–74.
- Seki M, Oomizu S, Sakata K-M, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, Ito K, Takeshita K, Niki T, Saita N, et al. 2008.** Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the

induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* **127**: 78–88.

Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, Meeker AK, Isaacs WB, Drake CG. 2008. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **14**: 3254–3261.

Sharkey MS, Lizée G, Gonzales MI, Patel S, Topalian SL. 2004. CD4(+) T-cell recognition of mutated B-RAF in melanoma patients harboring the V599E mutation. *Cancer Research* **64**: 1595–1599.

Shishido T, Hachisuka M, Ryuzaki K, Miura Y, Tanabe A, Tamura Y, Kusayanagi T, Takeuchi T, Kamisuki S, Sugawara F, et al. 2014. EpsinR, a target for pyrenocine B, role in endogenous MHC-II-restricted antigen presentation. *European Journal of Immunology* **44**: 3220–3231.

Shklovskaya E, Terry AM, Guy TV, Buckley A, Bolton HA, Zhu E, Holst J, Fazekas de St. Groth B. 2016. Tumour-specific CD4 T cells eradicate melanoma via indirect recognition of tumour-derived antigen. *Immunology and Cell Biology* **94**: 593–603.

Shui J-W, Kronenberg M. 2013. HVEM. *Gut Microbes* **4**: 146–151.

Simon S, Labarriere N. 2017. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology* **7**.

Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. 2009. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* **137**: 1270–1279.

Sinnathamby G, Eisenlohr LC. 2003. Presentation by recycling MHC class II molecules of an influenza hemagglutinin-derived epitope that is revealed in the early endosome by acidification. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **170**: 3504–3513.

Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, Belz GT. 2004. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nature Immunology* **5**: 1143–1148.

Smyth LA, Afzali B, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. 2007. Intercellular Transfer of MHC and Immunological Molecules: Molecular Mechanisms and Biological Significance. *American Journal of Transplantation* **7**: 1442–1449.

Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. 1988. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *Journal of Experimental Medicine* **167**: 183–196.

So T, Croft M. 2007. Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **179**: 1427–1430.

Sommermeier D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, Riddell SR. 2016. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* **30**: 492–500.

- Song J, Lei FT, Xiong X, Haque R. 2008a.** Intracellular signals of T cell costimulation. *Cellular & Molecular Immunology* **5**: 239–247.
- Song J, So T, Croft M. 2008b.** Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **180**: 7240–7248.
- Spiess PJ, Yang JC, Rosenberg SA. 1987.** In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *Journal of the National Cancer Institute* **79**: 1067–1075.
- Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Santo JPD, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, et al. 2013.** Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology* **13**: 145–149.
- Steinke JW, Borish L. 2001.** Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research* **2**: 66–70.
- Stern LJ, Potolicchio I, Santambrogio L. 2006.** MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Current Opinion in Immunology* **18**: 64–69.
- Sun Z, Chen F, Meng F, Wei J, Liu B. 2017.** MHC class II restricted neoantigen: A promising target in tumor immunotherapy. *Cancer Letters* **392**: 17–25.
- Szczepanik M, Bryniarski K, Tutaj M, Ptak M, Skrzeczynska J, Askenase PW, Ptak W. 2005.** Epicutaneous immunization induces alphabeta T-cell receptor CD4 CD8 double-positive non-specific suppressor T cells that inhibit contact sensitivity via transforming growth factor-beta. *Immunology* **115**: 42–54.
- Takaba H, Takayanagi H. 2017.** The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in Immunology* **38**: 805–816.
- Takeuchi A, Saito T. 2017.** CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Frontiers in Immunology* **8**: 194.
- Tamasauskiene L, Sitkauskienė B. 2018.** Role of Th22 and IL-22 in pathogenesis of allergic airway diseases: Pro-inflammatory or anti-inflammatory effect? *Pediatrics and Neonatology* **59**: 339–344.
- Tan NS, Ho B, Ding JL. 2002.** Engineering a novel secretion signal for cross-host recombinant protein expression. *Protein Engineering* **15**: 337–345.
- Tanaka M, Butler MO, Ansén S, Imataki O, Berezovskaya A, Nadler LM, Hirano N. 2011.** Induction of HLA-DP4-restricted anti-Survivin Th1 and Th2 responses using an artificial antigen-presenting cell. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**: 5392.
- Tatari-Calderone Z, Semnani RT, Nutman TB, Schlom J, Sabzevari H. 2002.** Acquisition of CD80 by Human T Cells at Early Stages of Activation: Functional Involvement of CD80 Acquisition in T Cell to T Cell Interaction. *The Journal of Immunology* **169**: 6162–6169.

- Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. 2004.** Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **53**: 79–85.
- Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. 2005.** A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nature Immunology* **6**: 287–294.
- Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. 2002.** Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology* **3**: 1156–1162.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. 2009.** Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews. Immunology* **9**: 581–593.
- Thiele F, Tao S, Zhang Y, Muschaweckh A, Zollmann T, Protzer U, Abele R, Drexler I. 2015.** Modified vaccinia virus Ankara-infected dendritic cells present CD4⁺ T-cell epitopes by endogenous major histocompatibility complex class II presentation pathways. *Journal of Virology* **89**: 2698–2709.
- Thompson JA, Figlin RA, Sifri-Steele C, Berenson RJ, Frohlich MW. 2003.** A phase I trial of CD3/CD28-activated T cells (Xcellerated T cells) and interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 3562–3570.
- Tjelle TE, Brech A, Juvet LK, Griffiths G, Berg T. 1996.** Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *Journal of Cell Science* **109**: 2905–2914.
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman W-H, Pagès F, et al. 2011.** Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Research* **71**: 1263–1271.
- Tougeron D, Maby P, Elie N, Fauquembergue E, Le Pessot F, Cornic M, Sabourin J-C, Michel P, Frébourg T, Latouche J-B. 2013.** Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers. *PloS One* **8**: e61001.
- Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu Y-C, Dudley ME, Wunderlich JR, Somerville RP, Hogan K, Hinrichs CS, et al. 2014.** Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science (New York, N.Y.)* **344**: 641–645.
- Turtle CJ, Swanson HM, Fujii N, Estey EH, Riddell SR. 2009.** A distinct subset of self-renewing human memory CD8⁺ T cells survives cytotoxic chemotherapy. *Immunity* **31**: 834–844.
- Tzifi F, Kanariou M, Tzanoudaki M, Mihas C, Paschali E, Chrousos G, Kanaka-Gantenbein C. 2013.** Flow cytometric analysis of the CD4⁺ TCR V β repertoire in the peripheral blood of children with type 1 diabetes mellitus, systemic lupus erythematosus and age-matched healthy controls. *BMC Immunology* **14**: 33.

- Ubaldi V, Gatta L, Pace L, Doria G, Pioli C. 2003.** CTLA-4 engagement inhibits Th2 but not Th1 cell polarisation. *Clinical & Developmental Immunology* **10**: 13–17.
- Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. 2015.** Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nature Immunology* **16**: 142–152.
- Umetsu SE, Lee W-L, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, Berry GJ, Nagumo H, Freeman GJ, Umetsu DT, et al. 2005.** TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nature Immunology* **6**: 447–454.
- Veerappan Ganesan AP, Eisenlohr LC. 2017.** The elucidation of non-classical MHC class II antigen processing through the study of viral antigens. *Current Opinion in Virology* **22**: 71–76.
- Végran F, Apetoh L, Ghiringhelli F. 2015.** Th9 cells: a novel CD4 T-cell subset in the immune war against cancer. *Cancer Research* **75**: 475–479.
- Végran F, Berger H, Boidot R, Mignot G, Bruchard M, Dosset M, Chalmin F, Rébé C, Dérangère V, Ryffel B, et al. 2014.** The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nature Immunology* **15**: 758–766.
- Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. 2008.** Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* **9**: 1341–1346.
- Verweij MC, Ressing ME, Knetsch W, Quinten E, Halenius A, van Bel N, Hengel H, Drijfhout JW, van Hall T, Wiertz EJHJ. 2011.** Inhibition of mouse TAP by immune evasion molecules encoded by non-murine herpesviruses. *Molecular Immunology* **48**: 835–845.
- Vigneron N, Stroobant V, Ferrari V, Abi Habib J, Van den Eynde BJ. 2018.** Production of spliced peptides by the proteasome. *Molecular Immunology*.
- Vigneron N, Van den Eynde BJ. 2014.** Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Biomolecules* **4**: 994–1025.
- Vijayasaradhi S, Xu Y, Bouchard B, Houghton AN. 1995.** Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *The Journal of Cell Biology* **130**: 807–820.
- Voelkl S, Moore TV, Rehli M, Nishimura MI, Mackensen A, Fischer K. 2009.** Characterization of MHC class-I restricted TCR α beta⁺ CD4⁻ CD8⁻ double negative T cells recognizing the gp100 antigen from a melanoma patient after gp100 vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **58**: 709–718.
- Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, Killeen N, Ishii N, Li XC. 2007.** OX40 costimulation turns off Foxp3⁺ Tregs. *Blood* **110**: 2501–2510.
- Waite JC, Skokos D. 2012.** Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *International Journal of Inflammation* **2012**: 819467.

- Wakim LM, Bevan MJ. 2011.** Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8⁺ T-cell activation after viral infection. *Nature* **471**: 629–632.
- Walseng E, Bakke O, Roche PA. 2008.** Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 14717–14727.
- Wang D, Aguilar B, Starr R, Alizadeh D, Brito A, Sarkissian A, Ostberg JR, Forman SJ, Brown CE. 2018.** Glioblastoma-targeted CD4⁺ CAR T cells mediate superior antitumor activity. *JCI Insight* **3**.
- Wang S, Bartido S, Yang G, Qin J, Moroi Y, Panageas KS, Lewis JJ, Houghton AN. 1999.** A role for a melanosome transport signal in accessing the MHC class II presentation pathway and in eliciting CD4⁺ T cell responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **163**: 5820–5826.
- Wang M, Chen P, Jia Y, He N, Li D, Ji C, Ma D. 2015.** Elevated Th22 as well as Th17 cells associated with therapeutic outcome and clinical stage are potential targets in patients with multiple myeloma. *Oncotarget* **6**: 17958–17967.
- Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM. 2007.** Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *European Journal of Immunology* **37**: 129–138.
- Wang X, Rickert M, Garcia KC. 2005.** Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science (New York, N.Y.)* **310**: 1159–1163.
- Wang T, Zhang Z, Xing H, Wang L, Zhang G, Yu N, Wang J, Guo W, Jiang J. 2017.** Elevated Th22 cells and related cytokines in patients with epithelial ovarian cancer. *Medicine* **96**: e8359.
- Watanabe M, Watanabe S, Hara Y, Harada Y, Kubo M, Tanabe K, Toma H, Abe R. 2005.** ICOS-mediated costimulation on Th2 differentiation is achieved by the enhancement of IL-4 receptor-mediated signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **174**: 1989–1996.
- Weiss S, Bogen B. 1989.** B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 282–286.
- Weiss S, Bogen B. 1991.** MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen. *Cell* **64**: 767–776.
- Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 2002.** 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **168**: 4897–4906.
- Wikenheiser DJ, Ghosh D, Kennedy B, Stumhofer JS. 2016.** The Costimulatory Molecule ICOS Regulates Host Th1 and Follicular Th Cell Differentiation in Response to Plasmodium chabaudi chabaudi AS Infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **196**: 778–791.

- Wikenheiser DJ, Stumhofer JS. 2016.** ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? *Frontiers in Immunology* 7.
- Wiles TA, Delong T, Baker RL, Bradley B, Barbour G, Powell RL, Reisdorph N, Haskins K. 2017.** An insulin-IAPP hybrid peptide is an endogenous antigen for CD4 T cells in the non-obese diabetic mouse. *Journal of Autoimmunity* 78: 11–18.
- Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. 2006.** Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 441: 890–893.
- Wilson KR, Liu H, Healey G, Vuong V, Ishido S, Herold MJ, Villadangos JA, Mintern JD. 2018.** MARCH1-mediated ubiquitination of MHC II impacts the MHC I antigen presentation pathway. *PLoS ONE* 13.
- Wing K, Sakaguchi S. 2010.** Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature Immunology* 11: 7–13.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, et al. 2001.** Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine* 7: 297–303.
- Xiao X, Balasubramanian S, Liu W, Chu X, Wang H, Taparowsky EJ, Fu Y-X, Choi Y, Walsh MC, Li XC. 2012.** OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nature Immunology* 13: 981–990.
- Xie MM, Dent AL. 2018.** Unexpected Help: Follicular Regulatory T Cells in the Germinal Center. *Frontiers in Immunology* 9.
- Xu G, Liu D, Okwor I, Wang Y, Korner H, Kung SKP, Fu Y-X, Uzonna JE. 2007.** LIGHT Is critical for IL-12 production by dendritic cells, optimal CD4+ Th1 cell response, and resistance to *Leishmania major*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179: 6901–6909.
- Xu L, Zhang Y, Luo G, Li Y. 2015.** The roles of stem cell memory T cells in hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology* 8.
- Xue H-H, Kovanen PE, Pise-Masison CA, Berg M, Radovich MF, Brady JN, Leonard WJ. 2002.** IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13759–13764.
- Yamane H, Paul WE. 2012.** Cytokines of the $\gamma(c)$ family control CD4+ T cell differentiation and function. *Nature Immunology* 13: 1037–1044.
- Yang Y, Hu L, Zheng H, Mao C, Hu W, Xiong K, Wang F, Liu C. 2013.** Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacologica Sinica* 34: 625–635.
- Yang Y, Kohler ME, Chien CD, Sauter CT, Jacoby E, Yan C, Hu Y, Wanhainen K, Qin H, Fry TJ. 2017.** TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance. *Science Translational Medicine* 9.

- Yang Y, Lin T, Jacoby E, Qin H, Gardner EG, Chien CD, Lee DW, Fry TJ. 2015.** CD4 CAR T Cells Mediate CD8-like Cytotoxic Anti-Leukemic Effects Resulting in Leukemic Clearance and Are Less Susceptible to Attenuation By Endogenous TCR Activation Than CD8 CAR T Cells. *Blood* **126**: 100–100.
- Ying H, Yang L, Qiao G, Li Z, Zhang L, Yin F, Xie D, Zhang J. 2010.** Cutting edge: CTLA-4--B7 interaction suppresses Th17 cell differentiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **185**: 1375–1378.
- Yoon DH, Osborn MJ, Tolar J, Kim CJ. 2018.** Incorporation of Immune Checkpoint Blockade into Chimeric Antigen Receptor T Cells (CAR-Ts): Combination or Built-In CAR-T. *International Journal of Molecular Sciences* **19**.
- Yu X, Ilecka M, Bartlett EJ, Schneidt V, Bhat R, Mautner J, Feederle R, Delecluse H-J. 2015.** Antigen-armed antibodies targeting B lymphoma cells effectively activate antigen-specific CD4+ T cells. *Blood* **125**: 1601–1610.
- Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. 2015.** Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cellular & Molecular Immunology* **12**: 566–571.
- Zhang X, Ing S, Fraser A, Chen M, Khan O, Zakem J, Davis W, Quinet R. 2013.** Follicular Helper T Cells: New Insights Into Mechanisms of Autoimmune Diseases. *The Ochsner Journal* **13**: 131–139.
- Zhao Y, Yang W, Huang Y, Cui R, Li X, Li B. 2018.** Evolving Roles for Targeting CTLA-4 in Cancer Immunotherapy. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* **47**: 721–734.
- Zheng P-P, Kros JM, Li J. 2018.** Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discovery Today* **23**: 1175–1182.
- Zhou D, Li P, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, Brutkiewicz RR, Blum JS. 2005.** Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* **22**: 571–581.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, et al. 2008.** TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature* **453**: 236–240.
- Zhou Y, Shao N, Aierken N, Xie C, Ye R, Qian X, Hu Z, Zhang J, Lin Y. 2017.** Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Journal of Cancer* **8**: 4098–4105.
- Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. 2005.** The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology* **6**: 1245–1252.
- Zhuang Y, Peng L-S, Zhao Y-L, Shi Y, Mao X-H, Guo G, Chen W, Liu X-F, Zhang J-Y, Liu T, et al. 2012.** Increased intratumoral IL-22-producing CD4(+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **61**: 1965–1975.

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine* **4**: 594–600.

Zou W, Restifo NP. 2010. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology* **10**: 248–256.

ANNEXES

Annexe I : Article : stimulation in vitro « personnalisée » de lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux basée sur l'utilisation de cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) codant des peptides dérivés de néoantigènes spécifiques de la tumeur, chez des patients atteints de cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire

Les résultats de cette étude seront très prochainement soumis à un journal scientifique international. J'ai participé à la construction des différentes lignées de CPAA, utilisées au cours de ces travaux, ainsi qu'aux expérimentations visant à stimuler les LT des patients avec ces cellules. Un résumé de cette étude est présenté ci-dessous.

Il est maintenant bien établi que la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur est associée à un meilleur pronostic dans le cadre des cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire (CCR à IMS). Cette réaction inflammatoire pourrait être expliquée par le statut particulier de ces tumeurs dans lesquelles des néoantigènes présents uniquement dans les cellules cancéreuses et potentiellement immunogènes sont retrouvés.

Nous avons étudié au laboratoire la corrélation entre certaines mutations *frameshift* retrouvées chez les patients et l'infiltrat lymphocytaire T, chez 61 patients atteints de CCR à IMS. Cette étude nous a ainsi permis de montrer une corrélation entre le nombre et le spectre des mutations retrouvées d'une part et la densité de LT infiltrant la tumeur d'autre part. Une autre étude sur un nombre de patients plus important (103 patients) atteints de CCR à IMS, utilisant des puces tissulaires (TMA, *Tissue Micro-Array*), nous a permis d'établir que la densité de LT CD8⁺ infiltrant la tumeur était corrélée au nombre et au spectre des mutations *frameshift*.

Nous avons également pu identifier chez plus de 60% des patients atteints de CCR à IMS, une mutation *frameshift* du gène *CASP5* 336,337. Cette mutation résulte de la perte d'une adénine (-1) dans une séquence répétée codante de 10 adénines du gène *CASP5*. Nous avons observé que cette mutation était la seule parmi celles que nous avons étudiées qui était associée à un moins bon pronostic chez les patients. La caspase 5 fait partie d'une famille de

protéines intervenant dans la mort cellulaire programmée et l'inflammation. Cette mutation pourrait conférer un avantage sélectif aux cellules tumorales, expliquant ainsi le moins bon pronostic observé chez ces patients.

Nous avons donc de solides arguments en faveur du développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie spécifique chez les patients atteints de CCR à IMS présentant cette mutation.

En utilisant quatre logiciels de prédiction différents, les peptides KMFFMVFLI (FSP25) et FLIIWQNTM (FSP26) ont été prédits comme étant des peptides HLA-A*0201-restreints pouvant être issus de la dégradation par le protéasome du néoantigène CASP5 (-1). Pour cette étude, nous avons donc construit des CPAA exprimant la caspase 5 mutée sous sa forme entière ou bien les néopeptides dérivés prédits. Nous avons ensuite montré que ces CPAA nous permettaient de monter des réponses immunitaires *in vitro* à partir du sang de patients HLA-A*0201+ atteints de CCR à IMS présentant la mutation CASP5 (-1).

ARTICLE (ORIGINAL MANUSCRIPT)

CASP5(-1) frameshift mutation in microsatellite unstable colorectal cancers is associated with a less good prognosis, but could be targeted in specific immunotherapy approach strategy by efficacious anti-tumor cytotoxic T cells

Hafid Kora¹, Sami Gouas¹, Pauline Maby¹, Alexandre Couture¹, Estelle Dupel¹, Jacques Mauillon², Nathalie Parodi², Jérôme Leprince³, Thierry Frébourg^{1,2}, Jean-Baptiste Latouche^{1,2}

¹Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245, Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), F76000, Rouen, France;

²Department of Genetics, Rouen University Hospital, F76000, Rouen, France;

³Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), F76000, Rouen, France

Corresponding author: Jean-Baptiste Latouche, Inserm U1245, IRIB, Faculty of Medicine, 22 boulevard Gambetta, 76183 Rouen CEDEX 1, France; phone: +33 2 32 88 03 97; Fax: +33 2 35 14 82 37; mail: jean-baptiste.latouche@chu-rouen.fr

Abstract

Colorectal cancers (CRCs) with microsatellite instability (MSI) represent ~15% of all CRCs, including CRCs in patients with a Lynch syndrome, the most frequent hereditary form of CRC. These CRCs are due to a DNA mismatch repair system deficiency that leads to mutations in DNA repeat sequences. Therefore, MSI CRCs accumulate frameshift mutations that can result in the synthesis of immunogenic neoantigens, presented as neo-peptides on HLA class I (HLA-I) molecules and targeted by a specific cytotoxic T cell response. These neo-peptides are identified as potentially immunogenic, and could be used as therapeutic targets in MSI-CRCs. We developed a personalized cellular adoptive immunotherapy strategy based on the *in vitro* stimulation of a given patient's cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against neoantigens derived from frameshift mutations detected in his tumor.

Methods: To detect tumor mutations, we designed three multiplex PCRs that amplify 32 coding repeat sequences in 29 genes. To activate specific CTLs *in vitro*, we constructed Artificial Antigen Presenting Cells (AAPCs) that can efficiently present a transgene-encoded peptide on the most frequently expressed HLA-I molecule, HLA-A*0201.

Results: We found that a proportion of a MSI CRC patient's tumor cells harbored a single nucleotide deletion of *CASP5* gene, leading to the synthesis of two neo-peptides (FSP25 and FSP26) predicted to be presented on the HLA-A*0201 molecule. We constructed AAPCs expressing each one of these neo-peptides to stimulate and expand tumor-specific peripheral CTLs from three HLA-A2⁺ MSI CRC patients. FSP25 and FSP26 was identified as immunogenic with FSP25 probably immunogenic more than FSP26 in cytotoxicity and IFN- γ secretion assay. Anti-tumor activity of activated CTLs were proven by lysis of HLA-A2.1⁺ microsatellite unstable colorectal cancer HCT116 cell line harboring *CASP5*(-1) mutation.

Conclusions: These preclinical data shown that, the mutated caspase-5 protein studied here and the FSP25, FSP26 peptide derived from, in the HLA A2 context, might be therapeutic targets of major interest for personalized specific immunotherapy strategies in the context of MSI CRCs, especially young Lynch patients, expressing the neoantigen.

Keywords: Neoantigen; Cytotoxic T lymphocyte; peptide; Artificial antigen presenting cell

Introduction

Colorectal cancers (CRCs) can evolve through two main pathways: one associated with chromosomal instability and the other one associated with microsatellite instability (MSI). MSI CRCs represent ~15% of all CRCs and are observed in Lynch syndrome, the most frequent hereditary form of CRC. MSI is due to a defect in the mismatch repair (MMR) machinery, involved in DNA replication fidelity. MSI CRCs that occur in the Lynch syndrome context (~15% of all MSI CRCs) are due to a hereditary germline mutation in one of the MMR genes, followed by the inactivation of the second allele in the tumor. These cancers affect mostly young patients with an average age of development of 45 year¹⁻³. Sporadic MSI CRCs (~85% of all MSI CRCs) are generally caused by the aberrant methylation of a MMR gene promoter, leading to gene silencing. This phenomenon, being mostly age-related, usually affects older individuals⁴.

Recent clinical trials in immunotherapy, based on the use of checkpoint inhibitors, which aim at reinforcing the natural cellular anti-tumor specific immune response, particularly the anti-PD-1 antibodies, have proven notable clinical benefits in MSI CRCs⁵⁻¹⁰. Indeed, in a phase I clinical trial, Le and colleagues noted that only one of 33 CRC patients responded to the anti-PD-1 monoclonal antibody⁵. This observation led them to study more precisely the cause of this unique response. It turned out that this patient had a MSI CRC. Subsequently, a Phase II clinical trial was launched to test the efficacy of pembrolizumab anti-PD-1 antibody with in microsatellite stable (MSS) CRCs and MSI CRCs patients, highlighting a clear benefit for MSI CRCs patients¹¹. These results have revived interest for cellular immunotherapy approaches in MSI CRCs, implying that adoptive cellular immunotherapy or vaccine therapy strategies involving specific antigen anti-tumor cellular immune response, might also be beneficial for MSI CRC patients.

Indeed, compared to MSS CRCs, MSI CRCs are more infiltrated with T lymphocytes (TLs), especially cytotoxic TLs (CTLs)^{12,13}, and are associated with a better prognosis^{14,15}. A stronger immunogenicity of these cancers could be explained by the fact that insertions and deletions due to DNA polymerase errors during replication, cannot be corrected when MMR system is defective¹⁵. When such a mutation occurs in a coding repeat sequence, a shift in the gene open reading frame can lead to the synthesis of a neoprotein, which exists only in tumor cells harboring this mutation. Intracellular degradation of such a protein can release

neopeptides presented in the groove of HLA-I molecules at the surface of mutated tumor cells. Such frameshift mutation-derived peptides (FSPs) have been shown to be targeted by TILs *in vitro*¹⁶ and seem to be recognized by specific CTLs *in vivo*, as strongly suggested by the correlation between CD8⁺ tumor infiltrating lymphocyte (TIL) density and frameshift mutation number and spectrum that we have recently reported in MSI CRCs¹⁷. As they are not shared with non-malignant tissues, FSPs could be particularly good targets for tumor specific immunotherapy strategies^{16,18–20}.

To activate and amplify *in vitro* CTLs against tumor antigens for the development of specific immunotherapy strategy (adoptive cellular immunotherapy or vaccine therapy), Artificial Antigen Presenting Cells (AAPCs), have been developed by our team²¹. AAPCs are NIH/3T3 murine fibroblasts, transduced to stably express HLA-A*0201 molecule, the most frequent HLA-I molecule, and the three main co-stimulatory molecules (CD54, CD58 and CD80). AAPCs can rapidly, at a limited cost, stimulate CTLs of donors sharing the same HLA molecule²¹. Such AAPCs have already been shown to efficiently present transgene-encoded FSPs, but also degrade full length antigens and present them in the form of immunogenic peptides to human TILs, like autologous cells^{17,22–24}. Thus, these cells constitute a unique tool to obtain clinically relevant specific TILs and confirm the immunogenic predicted peptides or peptides characterized by other approaches like mass spectrometry.

We undertook to preclinically develop a personalized immunotherapy strategy, based on the *in vitro* stimulation of a given patient's tumor-specific peripheral CTLs, with AAPCs presenting neopeptides derived from frameshift mutations previously detected in this patient's own tumor. This personalized immunotherapy strategy is currently based on the use of AAPCs encoding tumor neoepitopes already known and described in the literature (predicted *in silico* through bioinformatics softwares), resulting from mutated genes found in our patient tumors¹⁷. Several genes, containing short repeated sequences are frequently mutated MSI CRCs. In this study, we were particularly interested in *caspase-5* (*CASP5*) gene, which is found mutated in 60% of MSI CRCs^{17,25,26}. The loss of one adenine (-1A) in a coding sequence of 10 adenine (A) in *CASP5* gene could lead to the generation of a neoprotein, which could be degraded into neopeptides, including neopeptides KMFFMVFLI and FLIIWQNTM, respectively called FSP25 and FSP26²⁷. These neopeptides may be presented in the context of the HLA-A2.1 molecule^{16,27}. Proteases of the caspase family are linked to both programmed cell death²⁸ and immune and inflammatory responses and caspase-5

mutation could play a role in the progression of MSI CRCs as suggested in this study. FSP25 and FSP26 epitopes, could therefore be very interesting targets for specific immunotherapy in HLA-A2.1⁺ CASP5(-1) mutated MSI CRC patients. With our AAPCs, we have shown that FSP25 and FSP26 neopeptides are immunogenic in such patients, FSP25 being the most immunogenic more generally. CASP5(-1) neoantigen could be a good target for specific immunotherapy based on the activation of specific TLs in patients with CASP5(-1) mutation in their tumor .

Material and methods

Tumor samples and colorectal cancer cell lines

Biopsies were obtained from rectal or colon tumors of three HLA-A2.1⁺ (as assessed by flow cytometry in the laboratory) Lynch syndrome patients operated at Rouen University Hospital. In agreement with French law, these patients gave a written consent for the DNA mismatch repair system germline mutation analyses which were performed for medical purposes, and for giving blood for our functional study. HLA-A2.1⁺ colorectal cell lines Colo205 (MSS CRC) and HCT116 (MSI CRC), were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

Genomic DNA and RNA extraction

Genomic DNA was extracted from paraffin-embedded colorectal tissue biopsies, in the genetic somatic tumor laboratory using Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières, France), at Rouen University Hospital. For each patient, genomic DNA was extracted from tumor tissue and matched normal colorectal tissue. HCT116 and Colo205 cell line DNA extractions were performed using DNA extraction kit from Qiagen (Qiagen, Mainz, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA was extracted from these cell lines using RNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Assessment of tumor cell proportion within the tumor samples

As previously described^{17,25}, to evaluate the proportion of tumor cells within each tumor sample, we used the microsatellite instability profiles obtained by PCR amplification of the five mononucleotide repeats *BAT25*, *BAT26*, *NR21*, *NR22* and *NR24*, with a multiplex PCR kit (Qiagen). PCR products from normal and tumor DNA samples were separated on an ABI Prism 3100 DNA sequencer® (Applied Biosystems, Foster City, CA). The proportion of

tumor cells present within a tumor sample was determined by dividing the area of the unstable part of the profile corresponding to the most unstable microsatellite by the total area of this microsatellite profile.

Frameshift mutation detection

Three multiplex PCRs that simultaneously amplify 32 mononucleotide coding repeat sequences, included in 29 genes, were performed on paired normal and tumor DNA from three patients. PCRs were performed on paraffin-extracted DNA with a multiplex PCR kit (Qiagen). PCR products were then separated on an ABI Prism 3100 DNA sequencer® as already described^{17,25}, the patterns generated from tumor DNA and paired non-malignant tissue DNA were superimposed to detect shifts in the lengths of PCR products, which corresponded to mutations. The proportion of tumor cells harboring a mutation in a given repeat sequence, within a tumor sample, was calculated as followed: on the tumor PCR profile obtained from the amplification of this sequence, the area corresponding to mutated DNA was divided by the total area, corresponding to mutated and not mutated DNA^{17,25}. Then the proportion of mutated cells was divided by the proportion of tumor cells within the tumor sample. Multiplex PCRs were also performed on a MSI CRC cell line (HCT116) and a control MSS CRC cell line (Colo205), to detect mutations in HCT116 cells. RT-PCR and sequencing of the DNA regions that include *CASP5* coding repeat sequence were performed on RNA extracted from HCT116 and Colo205 cell lines.

Prediction of HLA-A*0201 restricted potentially immunogenic frameshift mutation-derived peptides

CASP5 mutated sequence was *in silico* derived from the wild-type gene sequence obtained from the NCBI server and *in silico* translated. Mutated part of the protein, coded by the sequence downstream of the mutation, was “blasted” to check for a possible match with unrelated normal protein. In case of a positive match, the matched part of the protein would have been eliminated, as it would not be a neoantigen which was not the case. The nonapeptides derived from *CASP5* mutated protein were then analyzed, to select the peptides displaying the highest binding scores for the HLA-A*0201 molecule with the algorithms available on SYFPEITHI, BIMAS, Rankpep and NetMHC websites²⁹⁻³¹.

Construction of Artificial Antigen Presenting Cells (AAPCs) expressing CASP5(-1) frameshift mutation-derived peptides or full length CASP5 mutated neoantigen

The construction of the AAPCs generated from NIH/3T3 fibroblast cell line has already been described^{17,21,22,32}. Briefly, gamma-retroviral vectors were used to express immunogenic antigen (peptide or full length protein) in AAPCs already transduced with gamma-retroviral vectors to express the main molecules of HLA-A2.1⁺ (AAPC^{A2.1}) immune synapse: human β 2-microglobuline, A*0201 heavy chain and the three human accessory molecules: ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58) and B7.1 (CD80)^{17,21,22,32}. For this study, the oligonucleotides of the peptides KMFFMVFLI (FSP25) and FLIIWQNTM (FSP26), synthesized in Eurogentec® (Kaneka Corporation, Liège, Belgium), were cloned downstream to the human CD8 α leader, in a replication defective gammaretroviral dicistronic SFG vector encoding puromycin resistance element. Insert encoding the mutated CASP5 full length protein deleted of one adenine (A) in a 10 A homopolymeric tract, was synthesized by gene synthesis service, GeneArt® (LifeTechnologies, Regensburg, Germany). This sequence was cloned in the same type of vector. As previously described²¹, H29/293GPG packaging cells were transfected with each plasmid by Calcium Chloride method and medium was harvested every 18 hours 3 days after transfection. These supernatants were used to infect AAPC^{A2.1} that are NIH/3T3 fibroblasts transduced with five replication-defective gamma-retroviral vectors encoding respectively the human β 2-microglobulin, the A*0201 heavy chain and the three human costimulatory molecules: ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58) and B7.1 (CD80)²¹. AAPC^{A2.1/FSP25} (expressing FSP25 peptide), AAPC^{A2.1/FSP26} (expressing FSP26 peptide) and AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} (expressing mutated CASP5 full length neo-protein), then generated were selected with puromycin (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) at 10 μ g/ml for two weeks.

Cells culture

AAPC^{A2.1/FSP25}, AAPC^{A2.1/FSP26} and AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}, were cultured in DMEM with 10% heat-inactivated donor calf serum (DCS, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Colo205 and HCT116 cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, ThermoFisher Scientific) containing 10% Fetal Calf Serum (FCS, ThermoFisher Scientific). Two mM L-glutamine (ThermoFisher Scientific) and a mix of antibiotics (100 UI/mL penicillin and 10 μ g/ml streptomycin, ThermoFisher Scientific) were added in all culture medium.

Flow cytometry

To determine their phenotype, 100,000 cells were washed and resuspended in PBS with 0.1% BSA (Bovin Serum Albumin, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 2mM EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, VWR, Fontenay-sous-Bois, France). After construction and before each coculture, AAPCs phenotype was verified by flow cytometry on a FACSCanto (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) after staining with anti-HLA-A2-FITC (fluorescein isothiocyanate), -human β 2-microglobulin-PE (phycoerythrin), -CD54-PE, -CD58-FITC, and -CD80-FITC antibodies from ThermoFisher Scientific. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from eight MSI CRC patients were used with the informed consent and upon agreement of the local ethic committee. For each patient, PBMCs from a blood sample (4ml) were collected by density centrifugation on a lymphocyte separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France) and stained with anti-HLA-A2-FITC, to verify their HLA-A status by flow cytometry on a FACSCanto. Three HLA-A2⁻ patients were excluded from the protocol.

Peripheral T lymphocyte *in vitro* stimulation with AAPCs

For three HLA-A2⁺ patients and three HLA-A2⁺ healthy donors, the day before stimulation, PBMCs from blood sample (15 to 40 ml) were collected the same way and AAPCs were irradiated (25 Gy), resuspended in AIM-V medium (ThermoFisher Scientific) with 5% DCS and plated (75 000 cells per well) in a 24-well plate. The next day, non-activated TLs were negatively sorted with a Dynabeads untouched human T cell kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions, and were resuspended in AIM-V medium, to be added (1.10^6 per well) on the AAPCs for a 21-day co-culture. Interleukin-2 (Proleukin, Chiron, Suresnes, France) was added at 20 IU/ml to the cocultures every second day from the 7th day of coculture.

Cytotoxicity assays

Cytotoxic activity of the stimulated TLs was assessed by standard ^{51}Cr release assays, as previously described³³. All target cells were HLA-A*0201⁺. T2 cells (ATCC) were loaded with different peptides (irrelevant, FSP25 or FSP26, synthesized by Rouen University Proteomic Platform, IRIB) at 10 μM for 1 h at room temperature. Colorectal cancer cell lines, HCT116 and Colo205, were incubated 24 hours with IFN- γ (Imukin, Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) at 200 IU/ml, to increase HLA molecules expression at the cell surface. Target cells were labeled with ^{51}Cr (for 1 h at 37°C) and distributed in 96-well U-bottomed plates (5000 per well) at different effector to target ratios. Target cells and TLs were incubated at 37°C, for 4 hours for the T2 cells, and 18 hours for the CRC cell lines. Percentage of cell lysis was calculated using the standard formula: [(mean experimental counts per minute (cpm) - mean spontaneous cpm)/(mean maximum cpm - mean spontaneous cpm)].

Measurement of IFN γ secretion by TL obtained after co-culture using an ELISpot assay (Enzyme-linked immunospot)

Elispots assay were performed, using a human IFN gamma ELISPOT Ready-SET-GO (Affymetrix eBioscience, Santa Clara, California). Nitrocellulose 96-well plates (Multiscreen, Millipore, Bedford, MA), were covered with anti-human IFN γ capture antibody (Affymetrix eBioscience) and the next day blocked with RPMI (ThermoFisher Scientific) medium containing 10% of fetal calf serum (FCS, ThermoFisher Scientific) at room temperature for 1h. TLs (10^5 per well) were plated in triplicate with T2 cells (5,000 per well) loaded with different peptides (irrelevant, FSP25 or FSP26). After incubation for 18 hours at 37 ° C, plates were washed, incubated with biotinylated anti-human IFN γ detection antibody (Affymetrix eBioscience) for 2 h and washed. Plates were then incubated with avidin-HRP reagent (eBioscience Affymetrix) for 45 minutes, and washed. Spots were detected by incubation (1minute to 1 hour) with AEC (3-amino-9-ethyl carbazole) substrate (Affymetrix eBioscience). The reaction was stopped with water, and after drying, the spots were counted using an ELISpot reader (CTLImmunoSpot®, Bonn, Germany). The specific number of spots is obtained, by subtracting the number of spots obtained under the conditions control (T2 loaded with irrelevant peptide) from spots obtained under the conditions tested (T2 loaded with FSP25 or FSP26).

Results

Survival of MSI CRC patients with a *CASP5*(-1) mutation is less than not mutated patients

Kaplan-Meier survival curve were realized with 71 MSI CRC patients subdivided in two groups. The first group contained 22 MSI CRC patients not mutated for *CASP5* gene. The second group contained 49 MSI CRC patients with *CASP5*(-1) mutation. In these second group more deaths (25 %) than in the first group (9%). Using a non-parametric Log Rank statistical test with a significance level of less than 0.05 (pvalue < 0.05), we observed that the survival of MSI CRC patients presenting this *CASP5*(-1) mutation is significantly (p = 0.0419) less than not mutated patients (Figure 1).

Construction of AAPCs of interest encoding FSP25 or FSP26 peptide and full length mutated neoantigen *CASP5*

Among the eight MSI CRC patients who agreed to be involved in our preclinical study, three were HLA-A2⁺ (phenotyped in the lab, data not shown), hence eligible for our personalized immunotherapy strategy based on the stimulation of peripheral CTLs with AAPCs expressing HLA-A*0201 (AAPC^{A2.1}). A few clinical characteristics of these three MSI CRC patients are given in Table 1.

The first step was to select HLA-A*0201-restricted peptides that are specific of a given patient's tumor. We have developed three multiplex PCR to detect frameshift mutations in 29 genes containing repetitive sequences coding^{17,25}. These genes have been selected because their mutations in MSI CRCs are known to be frequent, involved in carcinogenesis or immunogenic²⁵. With the first multiplex, we have found a frameshift mutation of *CASP5* gene present in tumors of the P2 and P3 patients mentioned above. In P1 no mutations were detected. A shift of the fluorescence peak (Figure 3), indicating a deletion of a nucleotide (-1A) in the tumor DNA sequence occurred, was observed. This mutation bearing by the primary tumor of these three patients, was respectively present in 0%, 13% and 98% of P1, P2 and P3 tumor cells. For this mutation, we obtained *in silico* the mutated protein amino acid sequence. Then, we selected the nonapeptides, contained in the mutated part of *CASP5* (-1) protein, with the highest affinity for the HLA-A*0201 molecule, given by SYFPEITHI prediction website algorithm³¹. *CASP5* (-1) neo-protein contain respectively the neo-peptides KMFFMVFLI and FLIIWQNTM, respectively called FSP25 and FSP26²⁷, with a SYFPEITHI HLA-A*0201 binding score prediction of 21 and 20. It was verified by

“blasting” that these peptides did not match with any normal human peptide. The FSPs coding sequence integrity in AAPC^{A2.1/FSP25}, AAPC^{A2.1/FSP26} and AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} was verified by genomic DNA sequencing (Figure 2C). A high level and stable expression of the HLA-A2.1, β 2-microglobulin, CD54, CD58 and CD80 transmembrane molecules were always observed by flow cytometry on artificial antigen-presenting cells, after transduction immunogenic peptide or full length protein transduction (Figure 2B).

Activated patients' TLs are cytotoxic against cells presenting tumor-specific frameshift mutation-derived peptides.

Peripheral TLs of each patients and three healthy donors HLA-A2⁺ were co-cultured separately with AAPC^{A2.1/FSP25}, AAPC^{A2.1/FSP26} or AAPC^{A2.1/CASP5 (-1)}. TLs were also co-cultured with AAPC^{A2.1/M1m}, encoding M1m peptide having a high affinity for HLA-A2.1, serving as positive control for activation capacity in our system of specific TLs. We have shown, in previous work^{17,33}, the ability of AAPC^{A2.1/M1m} to activate TL directed against M1m peptide in all HLA-A2 + donor. As assessed in standard ⁵¹Cr release assays, after one stimulation on with the different AAPCs, P1 and healthy donors peripheral CTLs have been able to specifically lysis T2 cells pulsed with M1m peptide, but not T2 cells pulsed with FSP25 or FSP26 peptides (Figure 3). For P2, after one stimulation, a specific lysis of M1m peptide (Up to 18% at 40:1 E/T ratio) was observed for TLs cultured with AAPC^{A2.1/M1m}. Specific lysis of FSP25 neo-peptide was also observed for the TLs cultured with AAPC^{A2.1/FSP25}. The maximum specific lysis was 12% for the 40: 1 E/T ratio, and the minimum specific lysis was 7% at a 10: 1 ratio. No significant cytotoxicity was obtained against the FSP25 and FSP26 neo-peptides for TLs cultured with AAPC^{A2.1/CASP5 (-1)}, and against the FSP26 neo-peptide for TLs cultured with AAPC^{A2.1/FSP26} (Figure 3). For P3, after one stimulation, a specific lysis of M1m peptide (Up to 40 % at 40:1 E/T ratio) was observed for TLs cultured with the AAPC^{A2.1/M1m}. Specific lysis of FSP25 neo-peptide was observed for TLs cultured with the AAPC^{A2.1/FSP25}. The maximum specific lysis for FSP25 starting with was 18% for the 40: 1 E/T ratio, and the minimum specific lysis was 10% at a 10: 1 ratio. Specific lysis of FSP25 neo-peptide was also observed for TLs cultured with AAPC^{A2.1/CASP5 (-1)}. The maximum specific lysis for FSP25 starting with was 10% for the 40: 1 E/T ratio, and the minimum specific lysis was 7% at a 10: 1 ratio. No significant cytotoxicity was obtained against the FSP26 neo-peptide with TLs cultured with the AAPC^{A2.1/CASP5 (-1)} and AAPC^{A2.1/FSP26} (Figure 3).

IFN γ production by activated TLs against FSP25 and FSP26

As P3, had better response, studies were completed with analysis of IFN γ secretion by TLs. High specific secretion of IFN γ was observed with P3's TLs cultured with AAPC^{A2.1/M1m}. The number of spots after subtraction of the background was 290 (Figure 4). A specific secretion of IFN γ was observed with the TLs cultured with AAPC^{A2.1/CASP5 (-1)} and AAPC^{A2.1/FSP25}, against FSP25 neo-peptide. The number of spots after subtraction of the background were respectively 120 and 50 (Figure 4). A specific secretion of IFN γ was also observed with the TLs cultured with AAPC^{A2.1/CASP5 (-1)}, against FSP26 neo-peptide. The number of spots after subtraction of the background was 50 (Figure 4). Weak IFN γ secretion, but specific, has also been observed with TLs cultured with AAPC^{A2.1/FSP26} against FSP26 neo-peptide. The number of spots after subtraction of the background was 7 (Figure 4).

Activated patients' TLs are cytotoxic against HLA-A2.1⁺ MSI CRC cell line HCT116

CASP5(-1) mutation found in HLA-A2.1⁺ MSI CRC cell line HCT116 genomic DNA by multiplex PCRs (Figure 5A) was also found by RT-PCR after HCT116 mRNA extraction and cDNA sequencing (data not shown). Peripheral CTLs of P3, stimulated with AAPC^{A2.1/FSP25}, AAPC^{A2.1/FSP26} and AAPC^{A2.1/CASP5 (-1)} specifically lyse the HLA-A2.1⁺ MSI CRC cell line HCT116 (Up to 15 % at 40:1 E/T ratio), these cells therefore harboring the same mutations as the patient in CASP5 gene, i.e. single nucleotide deletions, leading to the synthesis of FSP25 and FSP26 (Figure 5B).

Discussion

During repeat sequence replication, DNA polymerase sometimes integrates a wrong number of nucleotides. Normally these mistakes are detected by the MMR system to be fixed. In MSI CRCs a defect in this MMR system results in an accumulation of frameshift mutations that can lead to the synthesis of tumor-specific neoantigens. In order to develop a personalized adoptive cellular immunotherapy approach, this preclinical project consisted initially of characterizing the frameshift mutations present in the tumor of a given HLA-A2.1⁺ patient with MSI CRC, in a second step, to stimulate TLs of the peripheral blood of this patient, specific for neopeptides resulting from these mutations, and, in a third step, to check the cytotoxic activity of the stimulated TLs. To stimulate efficiently CTLs against tumor antigens for the development of specific adoptive cellular immunotherapy or vaccine therapy, AAPCs have been developed by our team²¹. Our previous work has demonstrated that AAPCs are able of effectively presenting the transduced peptides but also of fragmenting protein into immunogenic peptides presented within the HLA-A2.1 groove^{17,23,24,32,33}. Previously, we also developed three multiplex PCRs to detect frameshift mutations in 29 genes containing repeating coding sequences^{17,25}. With these multiplexes, we identified different frameshift mutations present in the tumors of three patients with Lynch syndrome. Using the predictions algorithms, we selected three neopeptides showing a strong affinity for the HLA-A2.1 molecule FSP02, FSP27 and FSP30 derived respectively from the (-1) mutation of the *ASTE1*, *TGFBR2* and *TAF1B* genes, which are mutations found at very high frequencies in MSI CRCs. We then stimulated the peripheral TLs of these patients with AAPCs presenting the neopeptides corresponding to the neoantigens expressed in their tumors. TLs activated were able to specifically lysis target cells presenting the neopeptides of interest, including tumor cells expressing the same neoantigens. These results constituted the proof of concept that it should be possible, after optimizing this system, to propose to patients with MSI CRC, in particular young patients with Lynch syndrome, an adoptive cellular immunotherapy targeting antigens expressed by their tumor cells.

Following this very encouraging work frameshift mutations were searched in three new HLA-A2.1⁺ patients. In the first patient, PCR multiplex analysis revealed absence of frameshift mutations, despite the MSI detected. As this patient has an adenoma, this suggests that the MMR defect first manifests itself in microsatellites, probably because of the length of these repeated sequences. Since MSI is present, this suggests that over time mutations in the

repeating coding sequences will accumulate and that some of them may be at the origin or involved in the malignant transformation of MSI CRC. In the other two patients, several genes, including the *CASP5* gene, were mutated in the tumor of these patients. The mutation detected is a deletion of an adenine (A) contained in the repeating coding sequence of 10A present in the *CASP5* gene. The *CASP5* gene is involved in the inflammatory response and apoptosis, and its mutation could play an important role in the development and control of tumor progression. This mutation was found in 60% of the MSI CRC^{17,25}. The major argument that led us to study this mutation more specifically in these patients is the survival of patients affected by this mutation. As seen on the Kaplan-Meier survival curve, the patient group with the *CASP5*(-1) mutation, several of the deaths were observed. The survival of patients with this mutation would be worse than those without the *CASP5*(-1) mutation. A non-parametric Log Rank statistical test confirm that, the survival of MSI CRC patients presenting *CASP5*(-1) mutation is significantly ($p = 0.0419$) less better than patient without this mutation. Our hypothesis is that the presence of the mutation in the patients could, to a certain extent, render the tumor cells resistant to apoptosis. It is therefore interesting to develop new therapeutic approaches in the mutated MSI CRC with *CASP5* mutation such as the use of pro-apoptotic or inhibitors of anti-apoptotic molecules³⁴ but also approaches based on activation of specific TLs of *CASP5*(-1) neoantigen. The *CASP5*(-1) mutation, would lead to the potential generation of FSP26 neopeptide already described as immunogenic²⁷. However, for a therapeutic strategy, it is necessary to take into account the fact that the identified frameshift mutations could lead to the appearance of a stop codon just after the mutation. Indeed, the production of a neoantigen, will depend on the importance of the mechanism of NMD (Nonsense mediated mRNA decay). NMD is a "quality control" leading to the degradation of mRNA containing a premature stop codon at more than 50-55 nucleotides upstream of the last exon-exon junction³⁵. However, all mRNA with these criteria do not undergo NMD and, even when they are sensitive to it, this phenomenon is often incomplete. The transcription of the mutated *CASP5* gene generates mRNA containing a premature stop codon before the last exon, the degradation of which is predicted. But in the MSI CRC, a study showed that there could be resistance to the NMD system and that it could even be inhibited³⁶. In our study, in order to characterize the neopeptides derived from the mutation *CASP5*(-1), we analyzed the protein sequence of the mutated *CASP5* with four different prediction softwares (SYFPEITHI, BIMAS, Rankpep and NetMHC). These software's have predicted the KMFFMVFLI and FLIIWQNTM peptides as restricted HLA-A2.1 peptides, which may be derived from the mutated *CASP5* protein. Thanks to the

nomenclature of Von Knebel Doeberitz, we were able to see that these peptides were already known and corresponded respectively to the peptides FSP25 and FSP26. In addition, they were predicted to have a good affinity for the HLA-A2.1 groove. These FSP don't exhibit homology with an auto-antigen. The different phenomena of tolerance of the immune system will therefore certainly be less important for these FSP, derived from a neoantigen, expressed only by the tumor cells, than for auto-antigen. The FSP25 and FSP26 epitopes, resulting from the CASP5 mutation, were therefore selected for our study.

Our AAPCs are a tool of choice for validating *ex vivo* the immunogenicity of these neopeptides. AAPCs encoding for FSP25 (AAPC^{A2.1/FSP25}), FSP26 (AAPC^{A2.1/FSP26}) neopeptides and the CASP5 mutated neoantigen (AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}) were then constructed. In all healthy donors and patients tested, specific lysis of the M1m peptide were obtained, confirming the previous results of the team, and assuring us of the quality of our cocultures³³. As expected, no specific lysis of FSP25 and FSP26 was observed for the three healthy donors. This can be explained by the fact that the cells of healthy donors didn't have the mutation of the gene coding for caspase-5. The TLs anti-FSP25 and anti-FSP26 potentially present in these healthy donors are thus naive TLs that our AAPCs are probably not able to stimulate effectively. Until now, we have never stimulated a specific T response from TLs having never encountered *in vivo* their antigen with our AAPCs.

In the first patient, no specific lysis of FSP25 and FSP26 was observed. The TLs anti-FSP25 and anti-FSP26 potentially present in this patient are therefore also naive TLs that our AAPCs are probably not able to stimulate efficiently. This suggest that the mutation is therefore not present in the patient, but more certainly has never been present. Indeed, since this patient did not show a mutation of *CASP5* according to the multiplex PCR, if we had been able to activate FSP25 and FSP26-specific CTLs with our AAPCs from the peripheral blood of this patient, this suggests that an immune response against the tumor cells carrying the mutation has already taken place during the development of the tumor, leading to their elimination. Indeed, previously in (apparenté) bearing a TGFβR2(-1) mutation we have already been able to activate TLs against FSP02 neopeptide resulting from this mutation (data not shown).

In the second patient, specific cytotoxic responses against FSP25 were observed. However, we were not able to stimulate specific cytotoxic responses against FSP26. Although very present, it is true that the responses obtained with our positive control, M1m, and with FSP25 were relatively low. This may be due to the different chemotherapies that this patient received so that the immune system was a little weakened when taking blood for our studies. More generally, the patient may also have unreactive TLs. It should be noted that in this patient there were few tumor cells (13%) carrying the mutations. In third patient, a specific lysis of FSP25 was obtained for TLs coculture with AAPC^{A2.1/FSP25}, but also for TLs coculture with AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}, showing that our AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} well degraded the antigen and presented the FSP25 peptide. Moderate lysis of FSP26 was observed for TLs coculture with AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} and AAPC^{A2.1/FSP26}. However, the responses obtained with our positive control, M1m, were relatively good. It should be noted that in this patient, almost all tumor cells (98%) were carrying the mutation. The study of IFN-gamma secretion confirmed the results of the cytotoxic tests for FSP25 in Patient 3, an IFN-gamma secretion against the FSP25 peptide for TL coculture with AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} and the AAPC^{A2.1/FSP25}. Interestingly, in spite of negative cytotoxic tests, we also observed an IFN-gamma secretion against the FSP26 peptide for TL coculture with AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}, showing that our AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} well degraded the antigen and presented the peptide FSP26, and the AAPC^{A2.1/FSP26}. The stronger responses against FSP25 and FSP26 here with AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} than with AAPC directly encoding the peptides could be explained by better presentation of these peptides after degradation of the full length antigen as already seen with other antigens²². However, this phenomenon has not been observed in cytotoxic tests and will have to be studied more precisely later.

In this study, we were able to stimulate TLs against the mutated CASP5 protein. The responses obtained with FSP25 were greater than FSP26. The specific TLs obtained efficiently lysed HLA-A2.1⁺ MSI CRC HCT116 cell line. These cells degraded well the antigen and presented the peptide FSP25 or FSP26. Lysis on a tumor cell demonstrates an absence or incomplete NMD for CASP5, but also demonstrates an incomplete resistance for apoptosis *in vitro*. Therefore, this neoantigen represents a target of great therapeutic interest for adoptive cell or vaccine therapies. Combined cellular approaches based on specific TLs against FSP25 neopeptide, FSP26 neopeptide or CASP5 mutated full length protein with an inhibitors of anti-apoptotic proteins could therefore be effective for the treatment of MSI CRCs patients with this CASP5 (-1) mutation. Using our AAPCs, we demonstrate that MSI

CRC patients with *CASP5(-1)* mutation that have a less good prognosis could be rescued by cytotoxic T cell responses targeting the mutated protein. Our AAPCs are a prime tool for the development of adoptive cell and vaccine therapy in microsatellite instability colorectal cancers.

Conflict of interest: the authors disclose no potential conflict of interest.

Funding: *La Ligue Contre le Cancer de la Région Normandie* and *North-West Cancéropôle* provided H. KORA's PhD fellowship and financial support for the research project.

References

1. Tiwari, A. K., Roy, H. K. & Lynch, H. T. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* **109**, 151–158 (2016).
2. Lynch, H. T. *et al.* Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin. Genet.* **76**, 1–18 (2009).
3. Lynch, H. T., Snyder, C. L., Shaw, T. G., Heinen, C. D. & Hitchins, M. P. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 181–194 (2015).
4. Söreide, K., Janssen, E. a. M., Söiland, H., Körner, H. & Baak, J. P. A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br. J. Surg.* **93**, 395–406 (2006).
5. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3167–3175 (2010).
6. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–2465 (2012).
7. Chung, K. Y. *et al.* Phase II study of the anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody, tremelimumab, in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3485–3490 (2010).
8. Hoos, A. *et al.* Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin. Oncol.* **37**, 533–546 (2010).
9. Lesterhuis, W. J., Haanen, J. B. A. G. & Punt, C. J. A. Cancer immunotherapy--revisited. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 591–600 (2011).
10. Restifo, N. P., Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 269–281 (2012).
11. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).

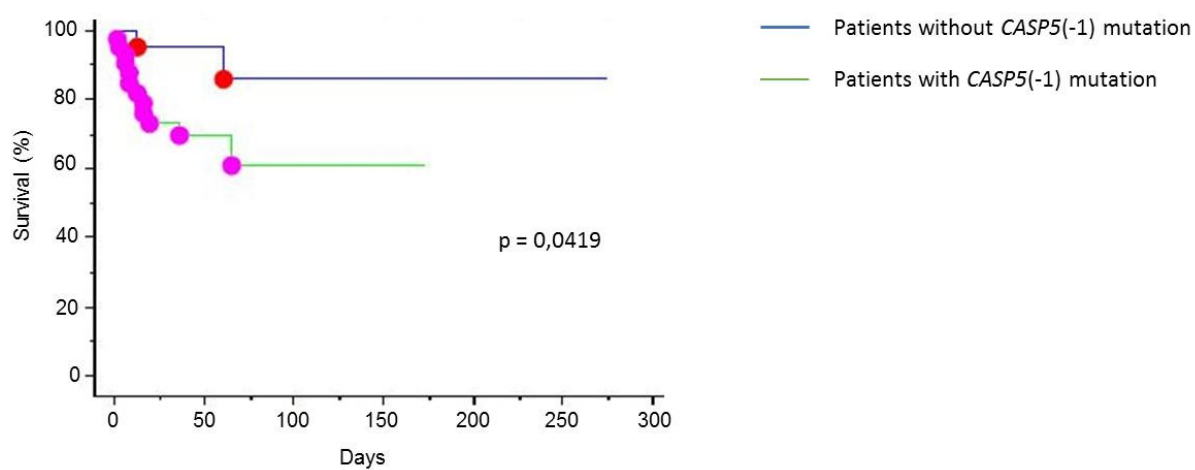
12. Michael-Robinson, J. M. *et al.* Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut* **48**, 360–366 (2001).
13. Takemoto, N. *et al.* The correlation of microsatellite instability and tumor-infiltrating lymphocytes in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and sporadic colorectal cancers: the significance of different types of lymphocyte infiltration. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **34**, 90–98 (2004).
14. Sinicrope, F. A. *et al.* Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* **137**, 1270–1279 (2009).
15. Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073–2087.e3 (2010).
16. Schwitalle, Y. *et al.* Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* **134**, 988–997 (2008).
17. Maby, P. *et al.* Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res.* **75**, 3446–3455 (2015).
18. Ishikawa, T. *et al.* Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* **63**, 5564–5572 (2003).
19. Linnebacher, M. *et al.* Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int. J. Cancer* **93**, 6–11 (2001).
20. Garbe, Y., Maletzki, C. & Linnebacher, M. An MSI tumor specific frameshift mutation in a coding microsatellite of MSH3 encodes for HLA-A0201-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes. *PloS One* **6**, e26517 (2011).
21. Latouche, J. B. & Sadelain, M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat. Biotechnol.* **18**, 405–409 (2000).

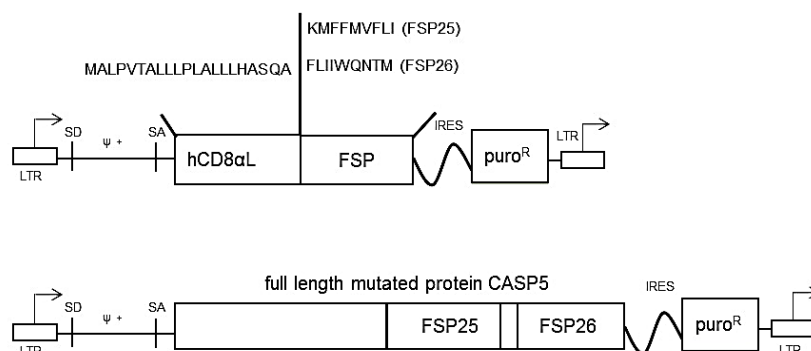
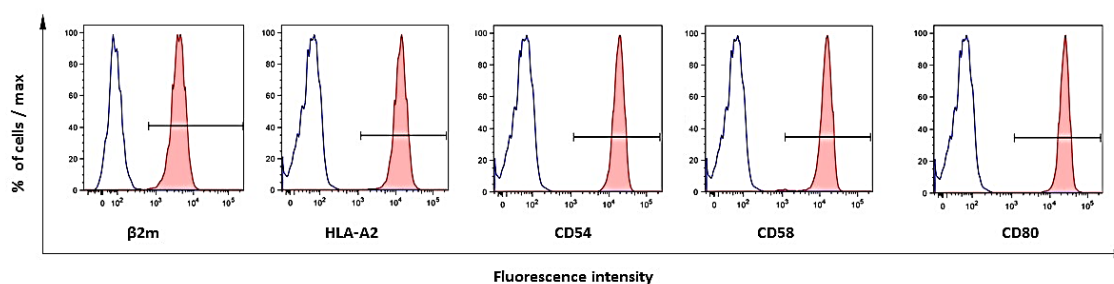
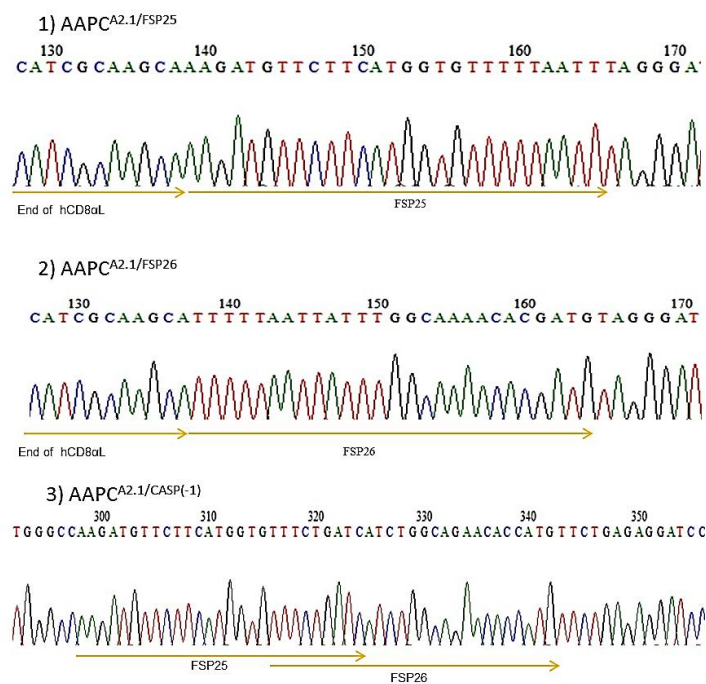
22. Fauquembergue, E. *et al.* HLA-A*0201-restricted CEA-derived peptide CAP1 is not a suitable target for T-cell-based immunotherapy. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 **33**, 402–413 (2010).
23. Papanicolaou, G. A. *et al.* Rapid expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells expressing a single HLA allele. *Blood* **102**, 2498–2505 (2003).
24. Garnier, A. *et al.* Artificial antigen-presenting cells expressing HLA class II molecules as an effective tool for amplifying human specific memory CD4(+) T cells. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 662–672 (2016).
25. Tougeron, D. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **22**, 1186–1195 (2009).
26. Soung, Y. H. *et al.* Mutational analysis of caspase 1, 4, and 5 genes in common human cancers. *Hum. Pathol.* **39**, 895–900 (2008).
27. Schwitalle, Y., Linnebacher, M., Ripberger, E., Gebert, J. & von Knebel Doeberitz, M. Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Cancer Immun.* **4**, 14 (2004).
28. Munday, N. A. *et al.* Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICErelII and ICErelIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J. Biol. Chem.* **270**, 15870–15876 (1995).
29. Stevanovic, S. Antigen processing is predictable: From genes to T cell epitopes. *Transpl. Immunol.* **14**, 171–174 (2005).
30. Parker, K. C., Bednarek, M. A. & Coligan, J. E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **152**, 163–175 (1994).
31. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanović, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213–219 (1999).

32. Chatillon, J.-F. *et al.* Direct Toll-Like Receptor 8 signaling increases the functional avidity of human CD8⁺ T lymphocytes generated for adoptive T cell therapy strategies. *Immun. Inflamm. Dis.* **3**, 1–13 (2015).
33. Fauquembergue, E. *et al.* HLA-A*0201-restricted CEA-derived peptide CAP1 is not a suitable target for T-cell-based immunotherapy. *J. Immunother. Hagerstown Md* **1997** **33**, 402–413 (2010).
34. Carter, B. Z. *et al.* Combined targeting of BCL-2 and BCR-ABL tyrosine kinase eradicates chronic myeloid leukemia stem cells. *Sci. Transl. Med.* **8**, 355ra117 (2016).
35. Nagy, E. & Maquat, L. E. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 198–199 (1998).
36. Williams, D. S. *et al.* Nonsense mediated decay resistant mutations are a source of expressed mutant proteins in colon cancer cell lines with microsatellite instability. *PloS One* **5**, e16012 (2010).

Table 1: Clinical characteristics of the three patients included in the study

Patients				Tumor		Treatment	
n°	Year of birth	Sex	Age at diagnosis	Location	TNM Stage	Surgery	Others
Patient 1 (P1)	1970	M	41 years	Colon	Adenoma	Yes	-
Patient 2 (P2)	1967	F	34 years	Rectum	pT2N0	Yes	Chemotherapy
Patient 3 (P3)	1958	F	42 years	Colon	pT3N2Mx	Yes	Chemotherapy

**Figure 1**

A**B****C****Figure 2**

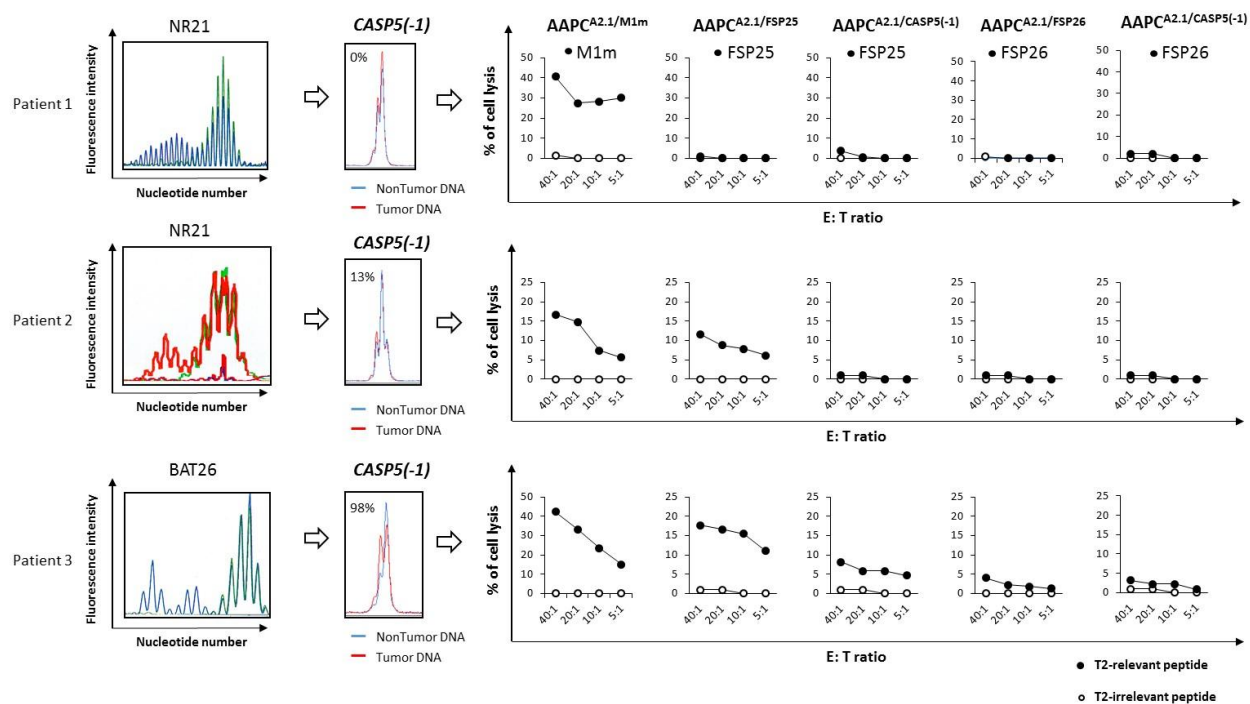


Figure 3

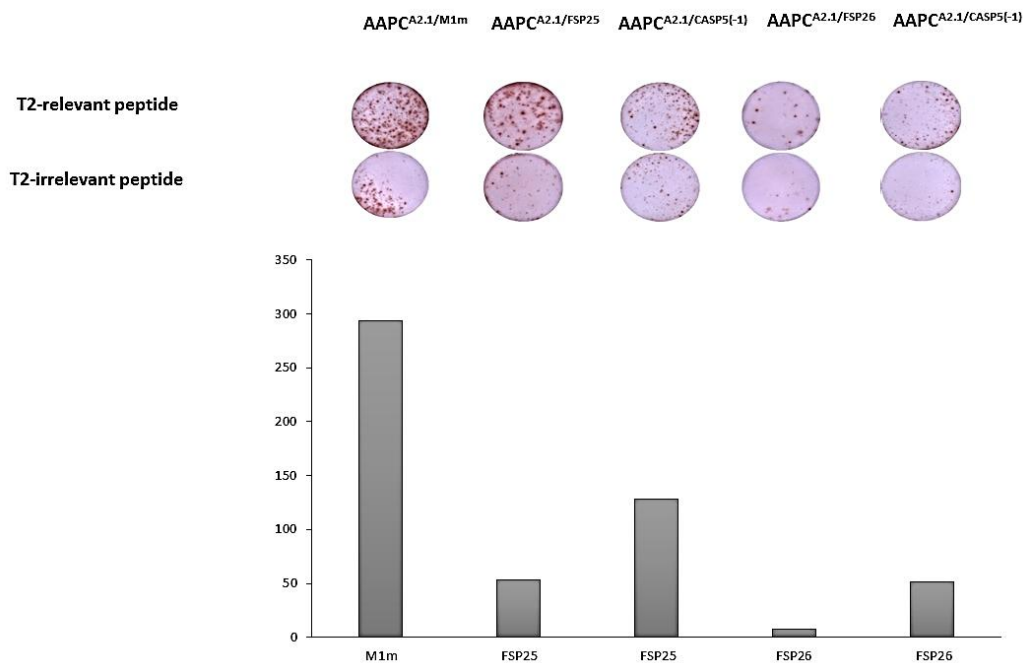


Figure 4

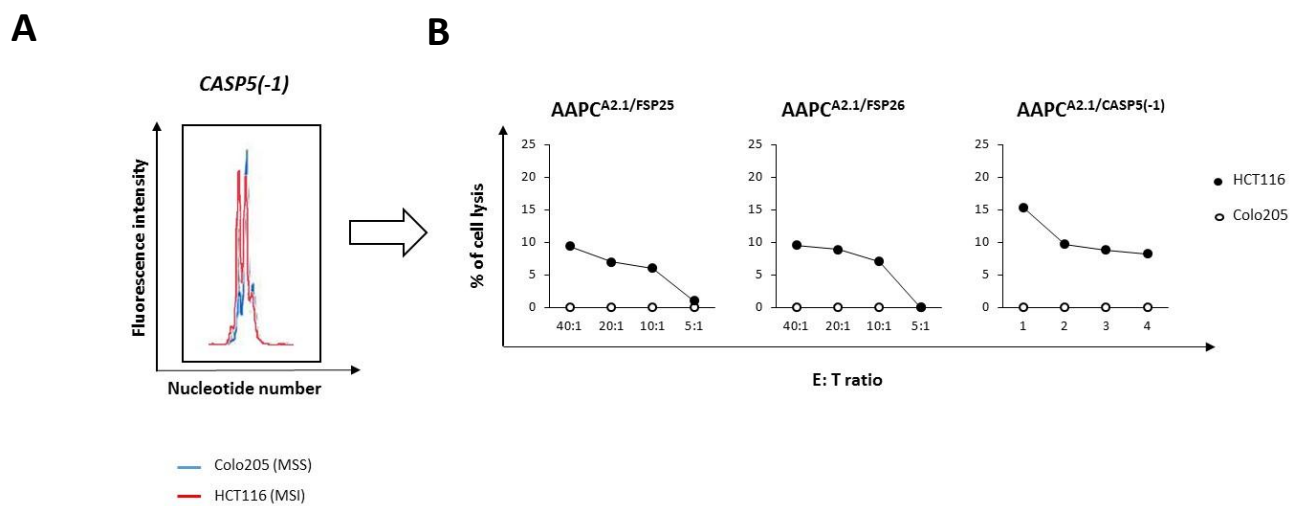


Figure 5

Figure 1: Survival of MSI CRC patients is worsened by *CASP5(-1)* frameshift mutation in their tumor.

Kaplan-Meier survival curves are presented for two groups of MSI CRC patients. The first composed of 22 MSI CRC patients with no *CASP5(-1)* frameshift mutation in their tumor and the second is composed of group 49 MSI CRC patients with *CASP5(-1)* frameshift mutation in their tumor. Log Rank statistical test was performed (pvalue < 0.05).

Figure 2: Artificial antigen presenting cell (AAPC) features

A, FSP25 neopeptide, FSP26 neopeptide and CASP5 full length neoantigen are cloned in non-replicative dicistronic gammaretroviral vectors encoding a puromycin resistance element (puromycin-*N*-acetyltransferase, puro^R). Two types of vectors were obtained, the first type encoding FSP25 or FSP26 neopeptide fused to a signal peptide (derived from the human CD8 α leader, hCD8 α L), that targets the peptide into the endoplasmic reticulum, and the second type encoding CASP5 full length neoantigen. Extended packaging signal (Ψ^+) allows these plasmids to be encapsulated into viral particles after transfection into H29/293GPG packaging cells. (SD, splice donor site; SA, splice acceptor site). **B**, For all AAPCs, expression profiles of HLA-A2, β 2m, CD54, CD58 and CD80 molecules were confirmed by flow cytometry. Example of AAPC^{A2.1/FSP25} presented here. Anti-CD54-FITC, anti-CD58-FITC, anti-CD80-FITC, anti-HLA-A2-FITC and anti- β 2m-PE antibodies were used for labelling AAPCs. The positivity threshold was set according to the control IgG (blue peak). β 2m: β 2 microglobuline; FITC: fluoresceine iso-thyo-cyanate; PE : phyco-erythrin. **C**, Using genomic DNA sequencing, FSP25 and FSP26 coding sequence integrity in AAPC^{A2.1/FSP25}, AAPC^{A2.1/FSP26} and AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} was verified.

Figure 3: Lynch patient peripheral blood TLs can be activated against *CASP5(-1)* frameshift peptides when their tumor harbors the mutation.

Tumor microsatellite instability was analyzed in 3 Lynch patients (most mutated microsatellite tumor profile presented on the left for each patient), and *CASP5(-1)* frameshift mutation was locked for in their tumor (non-tumor and tumor DNA PCR profile shown on the right for each patient, percentages of mutated tumor cells calculated as described in the material and methods section are indicated). Specific cytotoxic activity of patient peripheral TLs stimulated with different AAPCs (AAPC^{A2.1/M1m}, AAPC^{A2.1/FSP25}, AAPC^{A2.1/FSP26} and AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}), was assessed using a standard ⁵¹Cr release assays on T2 cells pulsed with irrelevant or relevant peptides (M1m, FSP25 or FSP26) peptide at different effector to target (E:T) ratios. For microsatellite and *CASP5(-1)* PCR results, nucleotide number is showed on the x axis and fluorescence intensity on the y axis.

Figure 4: TLs obtained after coculture with, AAPC^{A2.1/FSP25}, AAPC^{A2.1/FSP26} and AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} secrete IFN-gamma in a specific manner.

Elispots were performed with patient 3 TLs incubated with T2 cells pulsed with relevant peptide (M1m, FSP25 or FSP26 peptide) or irrelevant peptide (upper panels). Lower panel histogram represents the numbers of spots obtained with T2 cells pulsed with relevant peptide (M1m, FSP25 or FSP26) after subtraction of the number of non-specific spots obtained with T2 cells pulsed with an irrelevant peptide. The effector (TL) to target (T2) ratio used was 20:1.

Figure 5: Frameshift peptide-specific TLs are cytotoxic against HLA-A2.1⁺ MSI CRC cell line HCT116.

Specific cytotoxic activity of patient 3 peripheral TLs stimulated with AAPC^{A2.1/FSP25}, AAPC^{A2.1/FSP26} or AAPC^{A2.1/CASP5(-1)} was assessed in standard ⁵¹Cr release assays on HLA-A2.1⁺, colorectal cancer cell lines HCT116 and Colo205, at different effector to target (E:T) ratios.

Annexe II : Revue : Cellules présentatrices d'antigène artificielles exprimant une molécule HLA-II dans les stratégies d'immunothérapie cellulaire basées sur l'activation in vitro de LT CD4⁺

Au cours de ma thèse, j'ai rédigé une revue scientifique en collaboration avec le Dr Olivier Toutirais (Inserm U1237, Caen). Celle-ci sera très prochainement soumise au journal scientifique international Frontiers in Immunology. Elle se focalise sur : (i) le rôle majeur des LT CD4⁺ effecteurs et régulateurs au cours des réponses immunitaires, (ii) leur utilisation en immunothérapie cellulaire dans le cadre des cancers, des infections virales, des maladies auto-immunes mais aussi des greffes d'organes (iii) sur l'intérêt des cellules présentatrices d'antigène artificielles exprimant une molécule HLA-II pour activer et amplifier in vitro des LT CD4⁺ humains fonctionnels, spécifiques d'antigène, pouvant être utilisés en thérapeutique.

REVIEW (ORIGINAL MANUSCRIPT)

HLA-class II Artificial Antigen Presenting Cells in CD4+ T cell based immunotherapy

Alexandre Couture¹, Brigitte Le-Mauff^{2,3}, Jean-Baptiste Latouche^{1,4}, Olivier Toutirais^{2, 3,5}

¹Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245, Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), F76000, Rouen, France;

²Inserm U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen University Hospital, F14000, Caen, France;

³Department of Immunology and Immunopathology, Caen University Hospital, F14000, Caen, France;

⁴Department of Genetics, Rouen University Hospital, F76000, Rouen, France;

⁵French Blood Service (Etablissement Français du Sang, EFS), F14000, Caen, France

Corresponding Author: Olivier Toutirais, Inserm U1237, GIP Cyceron, Boulevard Henri Becquerel, 14000 Caen, France. Phone: +33 2 31 47 01 63, Mail: toutirais-o@chu-caen.fr

Abstract

CD4⁺ T cells differentiate into various T helper subsets characterized by distinct cytokine secreting profiles that confer them effector functions adapted to a variety of infectious or endogenous threats. Regulatory CD4⁺ T cells are another specialized subset that plays a fundamental role in the maintenance of immune tolerance to self-antigens. Manipulating effector or regulatory CD4⁺ T cells responses is a promising immunotherapy strategy for chronic viral infections and cancer, as well as severe autoimmune diseases and transplantation, respectively. Adoptive T cell therapy (ACT) is an emerging approach that necessitates defining robust and efficient methods for the *in vitro* expansion of antigen T cell specific cells and then infusion into patients. To achieve this challenge, artificial antigen presenting cells (AAPCs) have been developed and offer a reliable and easy usable platform to stimulate and amplify antigen-specific CD4⁺ T cells. Here, we review the recent advances in the functions of CD4⁺ T cells in immunity and in immune tolerance; and their use in clinical setting of ACT. We also describe the characteristic of different AAPC models and the way to improve their stimulating functions. Finally, we discuss their potential interest both as a fundamental tool to decipher CD4⁺ T cells responses and as a reagent to generate clinical grade antigen specific CD4⁺ T cells for immunotherapy.

Keywords: CD4⁺ T lymphocytes, adoptive cell therapy, cancer, auto-immunity, artificial antigen presenting cells, HLA class II molecules

Introduction

Functionally distinct CD4⁺ T cell subsets orchestrate immune responses against pathogenic microorganisms or transformed cells (1, 2). Each types of CD4⁺ T helper (Th) cells are endowed with a specific cytokine profiles that regulate adaptive and innate immunity. For a long time, it is well known that CD4⁺ T cells have a crucial role to support CD8 and B cell responses. CD4⁺ T cells also exert direct anti-tumor and anti-viral roles based on their cytolytic activity and effector cytokine secretion. Besides CD4⁺ effector cells, CD4⁺ regulatory T (Tregs), consisting of thymus derived or induced Treg subsets, maintain peripheral tolerance to self-antigen by regulating other types of immune cells. In many autoimmune diseases, a defect in number or immunosuppressive function has been described in Treg from peripheral blood (3). Due to their multiple functions in immunity and tolerance targeting CD4⁺ T cells have important clinical applications to treat cancer and chronic viral disease, or to induce tolerance for autoimmune diseases and allograft. *In vivo* vaccination and/or *in vitro* approaches could be harnessed to develop CD4⁺ T cell-based immunotherapy. Several models of artificial antigen presenting cells (AAPCs) have been engineered by gene transfer to express presentation and costimulatory molecules needed to stimulate antigen-specific CD4⁺ T cells. In this review, we describe our current understanding of CD4⁺ T cell functions in immunity and immune tolerance and discuss their contribution in adoptive T cell immunotherapy. We also focus on AAPCs as a potent tool to induce specific CD4⁺ T cells *in vitro*. Finally we examine the different ways to optimize AAPC models with the goal to reinforce our basic knowledge of the human CD4 responses and to propose efficient expansion protocols for ACT.

Antigen presentation by MHC class II molecules and CD4 T cell activation

The function of the major histocompatibility complex class II (MHCII) molecules is to present antigen to CD4⁺ T cells. Their expression is preferentially restricted to professional antigen-presenting cells (APC) including dendritic cells (DCs), monocyte/macrophages and B lymphocytes. In human, MHCII molecules are encoded by the three polymorphic genes *HLA-DR*, *HLA-DQ* and *HLA-DP*. The two glycoprotein α and β chains of the MHCII molecules are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and are associated with the invariant chain (Ii), a chaperone molecule whose functions are to stabilize the conformation of the MHC dimer and to avoid the binding of endogenous peptide in the groove of MHCII molecules. The heterotrimer is then transported out of the ER through the Golgi apparatus to a specialized endosome, the MHC II compartment (MIIC), in which proteases such as cathepsins degrade Ii. Only a part of Ii, the class II invariant chain peptide (CLIP), is maintained in the MHCII groove (4). The non-classical MHCII molecule HLA-DM interacts with MHCII molecule and catalyses the exchange of CLIP with a high-affinity peptide. Action of HLA-DM is inhibited by another non-classical MHCII molecule, HLA-DO (5). Peptides non-covalently binding the MHCII molecules are mainly derived from exogenous self and non-self-proteins degraded in the endocytic pathway. Of note, a substantial fraction of MHC II-associated peptides proceeded from the cytosolic proteins through the autophagic pathway (6). Then, peptide-MHCII complexes (pMCHII) are transferred and displayed on the plasma membrane of APC for recognition by CD4⁺ T cells (Figure 1).

The activation of naïve CD4⁺ T cells is initiated by the interaction of TCR with specific pMCHII presented by professional APC. Close contact between T cell and APC leads to the formation of a specialized structure named the immunological synapse (7). To fully prime CD4⁺ T cells, antigenic signal is reinforced by costimulatory molecule interactions with APC and by cytokines secreted in the local environment (Figure 2). The main costimulatory molecule expressed by T cells is CD28, which interacts with CD80 and CD86 on APCs. CD40 molecule on APCs that binds CD40L on activated T cells is also critical for CD4⁺ T-cell responses at least in part by amplifying activation of APCs.

Effector CD4⁺ T subsets

CD4⁺ T cells differentiate in diverse effector T helper (Th) subsets producing characteristic cytokines adapted to their functions and providing to the host the capacity to develop optimal immune responses against different types of pathogens (Table 1) (8). Polarization of Th cells is governed by genetic program applying distinct transcription factors induced by environmental cytokines. The stability of polarized CD4⁺ T cell subsets is still debated since many extracellular and cytosolic signals may contribute to their complex plasticity (9). Th1 cells that produce large amounts of IFN- γ and express T-bet are involved in the defense against intracellular pathogens. They activate macrophages and help in the generation of effector and memory CD8⁺ T cells (1). The response against extracellular parasites is controlled by IL-4 producing Th2 cells that activate eosinophils. Th17 cells secrete the cytokines IL-17 and IL-22, and promote inflammatory response and mediate response to fungi and extracellular bacteria by activating neutrophils. T follicular helper (Tfh) cells are responsible for B cell help and humoral response against extracellular antigens supporting germinal center formation and antibody production. Th9 cells are mainly characterized by the transcription factor PU.1 and the secretion of IL-9 and are involved in anti-parasite response. Another population recently described is the CD4⁺ T cells that harbor cytolytic activity against MHCII target cells. Cell killing mechanisms involve perforin-granzyme or FAS-FASL pathways. *In vivo*, eomesodermin (eomes) transcription factor drive the development of CD4⁺ CTLs (10).

Regulatory CD4⁺ T cell subsets

CD4⁺ regulatory T (Tregs) cells are critical for maintaining peripheral tolerance and preventing autoimmunity. Depending on the expression of the transcription factor forkhead box protein 3 (Foxp3), Treg may be divided into two subsets: the classical Foxp3⁺ Tregs and the Foxp3-negative type 1 regulatory T (Tr1) cells. Foxp3⁺ Treg can be generated in the thymus (thymus-derived Treg cells, tTreg cells) or also be induced from naive T cells in the periphery (peripheral-induced Treg cells, pTregs) (11). A third type of Tregs, termed iTreg, represents the *in vitro*-induced Treg cells. Tr1 cells induced in periphery, secrete interleukin 10 (IL-10) and/or transforming growth factor beta (TGF-beta). Distinct intracellular and surface markers help in distinguishing between FOXP3⁺ Treg and Tr1 cells. In addition of their specific transcription factor, FOXP3⁺ Treg are identified by their constitutively high expression of cell surface IL-2R α chain (CD25) in the absence of the α -chain of IL-7R (CD127). Recently, coexpression of the lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) molecule and the integrin alpha2 subunit (CD49b) was shown to identify Tr1 cells (12). Tregs have a potent suppressive capacity towards a very broad range of immune cells. Foxp3⁺ Tregs and Tr1 cells share common mechanisms of immunosuppression including inhibitory cytokine production, metabolic disruption *via* the expression of ectoenzymes, cytotoxic activity and inhibition of antigen presenting cells (13). In many preclinical models, adoptive transfer of polyclonal Tregs has been shown to prevent autoimmune diseases including type 1-diabetes, encephalomyelitis autoimmune experimental; or control graft versus host disease (GVHD) and allograft rejection (13, 14).

Role of CD4 T cells in antitumor and antiviral adaptive responses.

Growing evidences in the literature indicate that CD4⁺ T cells have direct roles in antitumor and antiviral responses without contribution of CD8 or B cells. Several effector mechanisms have been described depending on experimental model and Th subsets investigated. Quezada *et al* have demonstrated that transfer of tumor-specific CD4⁺ in lymphopenic mouse results in rejection of large melanoma tumors (15). In this study, CD4⁺ T cells have a Th1-like phenotype, produce granzyme B and display a MHC class II-dependent cytotoxic activity. In a mouse adoptive transfer model, Th17-polarized T cells are also capable of rejecting melanoma tumors *via* an IFN- γ dependent mechanism (16). More recently, several studies highlighted anti-tumor properties of IL-9 producing CD4⁺ T cells (17). Purwar *et al* have found in the B16 melanoma mouse model that IL9 receptor deficient mice have accelerated tumor growth *in vivo* while injection of recombinant IL-9 prevents tumor progression (18). Other studies reported that anticancer effects of Th9 cells were mediated by production of IL-21 and their cytolytic activity (19).

CD8⁺ T cells are considered as the main effector cells of cancer and virus immunosurveillance, capable of killing tumors or infected cells and secreting immunostimulatory cytokines. Nevertheless, CD4⁺ T cell help is critical for maintaining CD8 T cell functions during anti-tumor response and chronic infection (20, 21). Indeed, CD4 T cells are required to fully activate and “license” DCs which can effectively prime CD8 T cells. CD40L-CD40 interactions between activated CD4⁺ T cells and DCs respectively, are crucial to increase their antigen-presenting and co-stimulatory capacities (10). However, primary CD8⁺ responses T cell could be induced in a T cell help independent manner by microbial pathogen infections that provide potent inflammatory stimuli. Additionally, cognate interactions between activated CD4⁺ T cells and DCs lead to the production of chemokines that facilitate the recruitment of naïve CD8⁺ T cells towards antigen bearing APC in the secondary lymphoid organs (22). Although there is a consensus on the requirement of T cell help for the generation of long-lived memory CD8⁺ T cells (23, 24), it is still discussed whether CD4⁺ T cells deliver a differentiation program during the priming phase or subsequently at later stages during the CD8 memory maintenance (25). Production of IL-2 by Th cells during the priming phase is crucial for an effective secondary CD8⁺ response (26). However, it has been shown that licensed DCs may provide signals that enable autocrine secretion of IL-2 by memory CD8 T cells. CD4⁺ helper T cells also stimulate IL-15 production by DC that favors induction of long-lived CD8⁺ T cells increasing expression of

anti-apoptotic molecule Bcl-xL (27). In the context of viral chronic infection, IL-21 is an essential component of CD4⁺ T cell help by avoiding clonal deletion and maintains CD8⁺ T cell function (28). Regulation of activation-induced cell death (AICD) by CD4⁺ T cells is a putative mechanism for the maintenance of CD8⁺ T cells response. It was reported that CD8⁺ T cells primed in the absence of CD4⁺ T cells undergo AICD mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (29). However, other studies do not confirm this mechanism using TRAIL-deficient mice. Furthermore, recently, CD4⁺ T cells have been shown to upregulate the expression of CD70 on DC, a costimulatory molecule that triggers the CD27 receptor on CD8⁺ T cells. CD70-CD27 interactions result in the delivery of a help program that amplifies CTL functions and downregulates inhibitory receptors such as PD-1 (30).

Neutralizing antibodies are a central component of adaptive immune responses against microbial pathogens. In the earlier decade, Tfh cells characterized by the expression of CXCR5 have been identified as the main provider of B cell help. CD40L on Tfh cells is the most prominent costimulatory molecule that promotes survival and proliferation of CD40-expressing B cells. Cytokines IL-4 and IL21 are necessary for the formation GC center and differentiation of B cells into long-lived plasma cells (31). Recently the role of Tfh in antitumor immunity was underlined by several reports. In colorectal cancer, gene expression analysis and tissue microarray analysis of tumor biopsies showed that tumor infiltrating Tfh and B cells correlated with patient disease-free survival (32). The authors also found that chemokine CXCL13 and IL-21 were key factors of adaptive immune in tumor environment. Infiltration of CXCL13-producing CD4⁺ follicular helper T cell was also associated with a better disease-free survival a higher preoperative response to chemotherapy (33).

CD4+ T cell-based immunotherapy

Clinical trials of ACT mainly focus on CD8+ effector cells and very few studies have investigated therapeutic potential of CD4+ T cells. One of the first approaches is based on the infusion of an autologous CD4+ T-cell clones. Hunder *et al* have isolated and expanded *in vitro*, New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1 (NY-ESO-1)-specific CD4+ T-cell clones from a refractory metastatic melanoma patient. After one infusion of few billion cells, the patient presented a durable clinical remission (34). Another clinical trial has been conducted with autologous CD4+ T cells from patients transduced with a TCR gene specific for melanoma-associated antigen 3 (MAGE-3) (35). In a cohort of 17 patients with metastatic solid cancer and treated with 10^7 to 10^{11} cells, one patient had a complete response and a partial response for three others.

With the advent of next generation sequencing (NGS) technologies, it is now possible to characterize mutations within patient's tumor and finally identify potential immunogenic neoantigens in many cancers such as melanoma or colon cancer (36, 37, 38). These findings have been translated in clinical applications. Tran *et al* have identified Th1 cells specific for a neoantigen from the erbb2 interacting protein (ERBB2IP) in a metastatic cholangiosarcoma patient's tumor (39). Two infusions of several billion of neoantigen-specific CD4+ tumor infiltrating lymphocytes (TILs) led to disease stabilization for more than one year. Ott *et al* have identified neoantigens in six advanced melanoma patients and vaccinated them with a pool of a synthetic long-peptide corresponding to the predicted neoantigens (40). No recurrences at 25 months after treatment were observed in four patients.

A major problem associated in stem cell hematopoietic transplantation, are *Epstein-Barr Virus* (EBV) or *cytomegalovirus* (CMV) reactivation, as well as opportunistic viral infections such as adenovirus which are fatal in 20% of cases (41, 42). To control these complications (43, 44), *in vitro* protocols have been developed to rapidly generate CD4+ and CD8+ multivirus-specific T cells by a single stimulation of donor peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with a pool of synthetic peptide covering the target viral antigens (45). In a recent clinical trial including 37 patients with infection after allogeneic HSCT, 92% have had a complete or partial response after treatment with one infusion of 10^7 virus-specific T cells (46).

Regulatory T cell-based immunotherapy

Compelling experimental data from mouse models indicate that adoptive immunotherapy harnessing immunosuppressive properties of CD4⁺ regulatory T cells is a promising therapeutic strategy for autoimmune diseases or allograft rejection. These approaches have the advantages to allow the accurate definition of the phenotype and the functions of infused cells and to avoid the toxicity of general immunosuppressive drugs. Human peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ Tregs, potentially including tTreg and pTreg, are the main source for cell therapy and makes up only 1 to 2% of human CD4⁺ T cells. Due to the low number of circulating Treg, translating Treg therapies from murine studies to human requires efficient protocols to generate large numbers of highly pure Treg. Usually, cell therapy protocols consisted in a first step of CD4⁺ CD25⁺ polyclonal Treg isolation using either magnetic or flow cytometry-based systems. Next isolated Treg were either directly infused into patients or stimulated *in vitro* with anti-CD3/anti-CD28-coated beads or in the presence of anti-CD3 mAb loaded K562-derived AAPC modified to express the high-affinity Fc receptor (CD64) and CD86 (see below) (47).

So far, the therapeutic potential of polyclonal Treg has been investigated for the treatment of GVHD and type 1 diabetes with some evidences of safety and clinical benefits (14, 48). A potential drawback for the use of polyclonal Treg in immunotherapy is the risk of inducing overall immune suppression and compromising beneficial immune responses. Autoantigen-specific Treg cells may make up a better alternative for the treatment of autoimmune disease conferring a more localized and targeted immunosuppression at the site of inflammation. Noteworthy, several reports highlighted that antigen-specific Tregs were significantly more efficient than polyclonal Tregs in regulating autoimmune or allogenic responses in animal models (49, 50). To generate antigen-specific Tregs, polyclonal CD4⁺ CD25⁺ could be stimulated with antigen-loaded APC or transduced with viral vector to express TCR that recognize a specific peptide. More recently, chimeric antigen receptor (CAR) designed to redirect human Treg toward donor-MHC class I molecules has been successfully used to prevent rejection in a skin xenograft transplant model (51, 52).

HLA class II-AAPCs : an attractive tool to activate and expand antigen-specific CD4⁺ T cells.

The main limit to develop efficient T cell expansion protocols for ACT is the availability of potent APCs. *In vivo*, DCs are the most efficient professional APCs to trigger functional adaptive T cell responses but their *in vitro* production is difficult to standardize in terms of number of cells, maintenance of the phenotype and functionality (53). In addition, this process requires supplementary blood from healthy donors or patients. In this context, AAPCs are an interesting alternative because they are especially engineered for amplifying functional antigen-specific T cells. AAPCs have the advantages to be easily and quickly available, and suitable for human T cell expansion in a reproducible manner.

Butler and Hirano have developed an AAPC model based on the human erythroleukemic cell line K562 which constitutively expresses the adhesion molecules CD54 and (Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) and CD58 (leukocyte function-associated antigen-3, LFA-3) but not HLA class I and II molecules (Figure 3A) (54). To induce human CD4⁺ T cell responses, K562 cells were genetically modified to express costimulatory molecule CD80 and CD83 and a single HLA-DR allele. In addition K562 cells were equipped with Ii and HLA-DM molecules to foster antigen processing and presentation. After multiple stimulation, these AAPCs exogenously loaded with peptides are able to expand Th1 central memory antigen-specific CD4⁺ T cells against infectious antigens without growing of Treg cells. Unfortunately, no comparison data are available regarding T cell priming capacities of these AAPCs versus autologous APCs, but K562-derived AAPCs appear less efficient than autologous monocytes to reactivate specific CD4 T cells. Spontaneously, K562 cells have a low ability to endocytose exogenous proteins. Transduction with CD64, a receptor for Fc fragment of IgG, improves the uptake and presentation of whole protein antigens under immune complex forms. K562-derived AAPCs have also been used to stimulate CD4⁺ T cells against tumor associated antigen (TAA) (55). However, TAA are inherently poorly immunogenic and CD4⁺ T cells need to be initially sensitized with antigen-pulsed autologous monocytes before restimulation with K562 cells. Interestingly, CD⁺ T cells are long-lived effector cells able to secrete IFN- γ and IL-4 after challenge with MHCII positive tumor cells.

Our group has designed another AAPC model using the mouse fibroblast cell line NIH/3T3 that have been retrovirally transduced with a single HLA molecule, the costimulatory molecule CD80, and the two adhesion molecules CD54 and CD58 (Figure 3B). Previously, these cells have been used to generate CTL responses by gene transfer with vectors encoding a single HLA class I molecule and an antigen under peptide or protein form (56, 57, 58). These AAPCs consistently elicit strong stimulation and expansion of anti-tumor or anti-viral CD8⁺ CTLs. Thereafter, using the same murine fibroblast backbone, novel AAPCs expressing a single HLA class II molecule have been constructed to investigate CD4⁺ T cell responses (59). We have demonstrated that these AAPCs loaded with peptide strongly activate specific CD4 T cell clones. In addition, they were able to efficiently and spontaneously take up, process extracellular whole proteins and then present an epitope to specific T cells. In primary stimulation, AAPCs enable expansion of antigen-specific CD4⁺ T cells, but with a lower stimulating ability than autologous APCs. Importantly, a major advantage of AAPC is their higher ability than autologous APCs to reactivate and amplify a high number of specific memory CD4⁺ T cells at a clinical scale for therapeutic applications. Expanded T cells harbor a transitional memory (CD45RO⁺, CD62L⁺, CCR7⁻) and effector memory (CD45RO⁺, CD62L⁻, CCR7⁻) phenotypes and are highly functional Th1 cells that secrete IFN- γ upon antigen specific stimulation.

Optimization of AAPC system and their use perspectives

We and other have shown that AAPC systems are a reliable platform to expand human CD4⁺ T cells (59, 60). Since AAPC model is customizable, it could be used as a tool for basic and/or applied research on CD4⁺ T cell responses. As a key step, antigen presentation could be optimize by genetic approaches addressing antigens into the various cell compartments (cytoplasm, ER, endosome) involved in the HLA class II presentation pathway. Indeed, endogenous antigen expression in the form of peptide or whole protein may foster their presentation as it was observed in HLA class I-AAPCs (56, 58). In addition, these antigen targeting strategies could also be exploited to dissect the alternative MHCII pathway which remains poorly understood (61, 62).

Manipulating expression of some costimulatory molecules on AAPC is another opportunity to increase T cell functions *in vitro*. The tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF) molecules CD27 and 4-1BB (CD137) are among the two costimulatory molecules that appear important to enhance CD4⁺ T cell response. CD27 is expressed on naïve and memory T cells and interactions with its ligand CD70 on APC promoted both Th1 differentiation *via* IL-12R β 2 up-regulation and survival of CD4⁺ T cells (63). Similarly, 4-1BB ligand on APC enhances proliferation and effector functions of activated CD4⁺ T cells that expressed 4-1BB (64, 65).

Co-signaling receptors also modulate differentiation of Treg. Interestingly, Program-death-ligand 1 (PD-L1) binding to PD-1 has been shown to induce the conversion of naïve T CD4⁺ CD25⁻ cells into iTreg in mouse models (66, 67). PD-L1 expressing AAPC could be a useful tool to study the role of the co-inhibitory molecule in human context.

In clinical and research immunology, AAPCs represent a convenient platform to monitor CD4⁺ T cell response of patients against allergens, autoantigens or infectious antigens as it was shown with the antigen ADAMTS13 involved in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura (68). In addition, since NIH/3T3-derived AAPCs are able to internalize and process whole protein antigen and present T cell epitopes, they can be useful to characterize new epitopes for therapeutic antigens.

Conclusion and perspectives

CD4⁺ T cells are the orchestra conductor of a broad range of immune responses. These last year's our understanding of the CD4⁺ T cell biology have progressed but remains incomplete. Indeed, diversity of CD4⁺ subsets cells is more complex than expected as attested by the discovery of discreet functional subsets and reports showing the influence of environmental cues in plasticity of Th cells and Tregs (3, 9, 69). Understanding the mechanisms underlying functional heterogeneity of CD4⁺ T cells will provide the opportunity to exploit their properties in protective immunity or in immune tolerance with the ultimate goal of developing potent immunotherapy strategies. Recent studies revealing the role of Tfh and Th9 subsets in anti-infectious and anti-tumor immunity raise the question of which class of Th cell is more adapted to mediate a protective response against specific diseases. In the Treg field, future works are required to characterize the best source of Treg for immunotherapy by determining relevant markers to distinguish tTregs cells from iTregs and carrying out clinical trials to compare clinical benefits of autoantigen-specific Tregs versus polyclonal Tregs in adoptive immunotherapy.

The development of several AAPC platforms has led up to reproducible and robust expansion protocols to generate high numbers of human antigen-specific CD4 T cells. In addition, AAPCs could be used in accordance with Good Manufacturing Practices and their safety and harmless have already been demonstrated in several clinical trials (70, 71, 72). These culture systems that also have the advantage of being easily customizable by gene transfer to express any costimulatory or inhibitory molecules offer an ideal tool to analyze all kind of CD4 responses and therefore provide key knowledges to maximize the success of T cell expansion in ACT protocols.

Funding: Alexandre Couture's PhD fellowship was provided by « La Ligue contre le Cancer de Seine-Maritime », France, and « La Région Normandie », France.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

1. Kim, H.-J., and Cantor, H. CD4 T-Cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunol Res* (2014) **2**: 91-98. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0216
2. Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. Expanding Roles for CD4⁺ T Cells in Immunity to Viruses. *Nat Rev Immunol* (2012) **12**: 136-48. doi: 10.1038/nri3152
3. Dominguez-Villar, M., and Hafler, D.A. Regulatory T Cells in Autoimmune Disease. *Nat Immunol* (2018) **19**: 665-73. doi: 10.1038/s41590-018-0120-4
4. ten Broeke, T., Wubbolts, R., and Stoorvogel, W. MHC Class II Antigen Presentation by Dendritic Cells Regulated through Endosomal Sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2013) **5**: a016873. doi: 10.1101/cshperspect.a016873
5. Poluektov, Y.O., Kim, A., and Sadegh-Nasseri, S. HLA-DO and Its Role in MHC Class II Antigen Presentation. *Front Immunol* (2013) **4**. doi: 10.3389/fimmu.2013.00260
6. Adamopoulou, E., Tenzer, S., Hillen, N., Klug, P., Rota, I.A., Tietz, S., Gebhardt, M., Stevanovic, S., Schild, H., Tolosa, E., et al. Exploring the MHC-Peptide Matrix of Central Tolerance in the Human Thymus. *Nat Comm* (2013) **4**: 2039. <https://doi.org/10.1038/ncomms3039>. doi: 10.1038/ncomms3039
7. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science* (1999) **285**: 221-27.
8. Sethi, A., Kulkarni, N., Sonar, S., and Lal, G. Role of MiRNAs in CD4 T Cell Plasticity during Inflammation and Tolerance. *Front Genet* (2013) **4**: 8. doi: 10.3389/fgene.2013.00008
9. DuPage, M., and Bluestone, J.A. Harnessing the Plasticity of CD4(+) T Cells to Treat Immune-Mediated Disease. *Nat Rev Immunol* (2016) **16**: 149-63. doi: 10.1038/nri.2015.18
10. Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Kaech, S.M. The Multifaceted Role of CD4(+) T Cells in CD8(+) T Cell Memory. *Nat Rev Immunol* (2016) **16**: 102-11. doi: 10.1038/nri.2015.10
11. Abbas, A.K., Benoist, C., Bluestone, J.A., Campbell, D.J., Ghosh, S., Hori, S., Jiang, S., Kuchroo, V.K., Mathis, D., Roncarolo, M.G., et al. Regulatory T Cells: Recommendations to Simplify the Nomenclature. *Nat Immunol* (2013) **14**: 307-8. doi: 10.1038/ni.2554
12. Gagliani, N., Magnani, C.F., Huber, S., Gianolini, M.E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D.R., Bulfone, A., Trentini, F., et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 Identifies Human and Mouse T Regulatory Type 1 Cells. *Nat Med* (2013) **19**: 739-46. doi: 10.1038/nm.3179

13. Zeng, H., Zhang, R., Jin, B., and Chen, L. Type 1 Regulatory T Cells: A New Mechanism of Peripheral Immune Tolerance. *Cell Mol Immunol* (2015) **12**: 566-71. doi: 10.1038/cmi.2015.44
14. Bluestone, J.A., Buckner, J.H., Fitch, M., Gitelman, S.E., Gupta, S., Hellerstein, M.K., Herold, K.C., Lares, A., Lee, M.R., Li, K., et al. Type 1 Diabetes Immunotherapy Using Polyclonal Regulatory T Cells. *Sci Transl Med* (2015) **7**: 315ra189. doi: 10.1126/scitranslmed.aad4134
15. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-Reactive CD4(+) T Cells Develop Cytotoxic Activity and Eradicate Large Established Melanoma after Transfer into Lymphopenic Hosts. *J Exp Med* (2010) **207**: 637-50. doi: 10.1084/jem.20091918
16. Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., et al. Tumor-Specific Th17-Polarized Cells Eradicate Large Established Melanoma. *Blood* (2008) **112**: 362-73. doi: 10.1182/blood-2007-11-120998
17. Lu, Y., Wang, Q., Xue, G., Bi, E., Ma, X., Wang, A., Qian, J., Dong, C., and Yi, Q. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4⁺ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* (2018) **33**: 1048-1060. doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.004
18. Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H.S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A.M., Khoury, S.J., Fuhlbrigge, R.C., Kuchroo, V.K., et al. Robust Tumor Immunity to Melanoma Mediated by Interleukin-9-Producing T Cells. *Nat Med* (2012) **18**: 1248-53. doi: 10.1038/nm.2856
19. Végran, F., Berger, H., Boidot, R., Mignot, G., Bruchard, M., Dosset, M., Chalmin, F., Rébé, C., Dérangère, V., Ryffel, B., et al. The Transcription Factor IRF1 Dictates the IL-21-Dependent Anticancer Functions of TH9 Cells. *Nat Immunol* (2014) **15**: 758-66. doi: 10.1038/ni.2925
20. Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C.J.M., and Kastenmüller, W. CD4⁺ T Cell Help in Cancer Immunology and Immunotherapy. *Nat Rev Immunol* (2018) **18**: 635-647. doi: 10.1038/s41577-018-0044-0
21. Dobrzanski, M.J. Expanding Roles for CD4 T Cells and Their Subpopulations in Tumor Immunity and Therapy. *Front Oncol* (2013) **3**: 63. doi: 10.3389/fonc.2013.00063

22. Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R.N. Chemokines Enhance Immunity by Guiding Naive CD8⁺ T Cells to Sites of CD4⁺ T Cell-Dendritic Cell Interaction. *Nature* (2006) **440**: 890-95. doi: 10.1038/nature04651
23. Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. A Role for CD40 Expression on CD8⁺ T Cells in the Generation of CD8⁺ T Cell Memory. *Science* (2002) **297**: 2060-63. doi: 10.1126/science.1072615
24. Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. CD4⁺ T Cells Are Required for Secondary Expansion and Memory in CD8⁺ T Lymphocytes. *Nature* (2003) **421**: 852-56. doi: 10.1038/nature01441
25. Sun, J.C., Williams, M.A., and Bevan, M.J. CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat immunol* (2004) **5**: 927-33. doi: 10.1038/ni1105
26. Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. Interleukin-2 Signals during Priming Are Required for Secondary Expansion of CD8⁺ Memory T Cells. *Nature* (2006) **441**: 890-93. doi: 10.1038/nature04790
27. Oh, S., Perera, L.P., Terabe, M., Ni, L., Waldmann, T.A., and Berzofsky, J.A. IL-15 as a Mediator of CD4⁺ Help for CD8⁺ T Cell Longevity and Avoidance of TRAIL-Mediated Apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2008) **105**: 5201-6. doi: 10.1073/pnas.0801003105
28. Elsaesser, H., Sauer, K., and Brooks, D.G. IL-21 Is Required to Control Chronic Viral Infection. *Science* (2009) **324**: 1569-72. doi: 10.1126/science.1174182
29. Sacks, J.A., and Bevan, M.J. TRAIL Deficiency Does Not Rescue Impaired CD8⁺ T Cell Memory Generated in the Absence of CD4⁺ T Cell Help. *J Immunol* (2008) **180**: 4570-76.
30. Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbała, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H., and Borst, J. CD4⁺ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* (2017) **47**: 848-861.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.009
31. Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.-F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., Liu, C., Schwartzberg, P.L., and Leonard, W.J. A Critical Role for IL-21 in Regulating Immunoglobulin Production. *Science* (2002) **298**: 1630-34. doi: 10.1126/science.1077002
32. Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* (2013) **39**: 782-95. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.003

33. Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. CD4⁺ Follicular Helper T Cell Infiltration Predicts Breast Cancer Survival. *J Clin Invest* (2013) **123**: 2873-92. doi: 10.1172/JCI67428
34. Hunder, N.N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D.W., Reilly, J.Z., Rodmyre, R., Jungbluth, A., Gnjjatic, S., Thompson, J.A., and Yee, C. Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous CD4⁺ T Cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* (2008) **358**: 2698-2703. doi: 10.1056/NEJMoa0800251
35. Lu, Y.-C., Parker, L.L., Lu, T., Zheng, Z., Toomey, M.A., White, D.E., Yao, X., Li, Y.F., Robbins, P.F., Feldman, S.A., et al. Treatment of Patients With Metastatic Cancer Using a Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted T-Cell Receptor Targeting the Cancer Germline Antigen MAGE-A3. *J Clin Oncol* (2017) **35**: 3322-3329. doi: 10.1200/JCO.2017.74.5463
36. Linnemann, C., van Buuren, M.M., Bies, L., Verdegaal, E.M.E., Schotte, R., Calis, J.J.A., Behjati, S., Velds, A., Hilkmann, H., Atmioui, D.E., et al. High-Throughput Epitope Discovery Reveals Frequent Recognition of Neo-Antigens by CD4⁺ T Cells in Human Melanoma. *Nat Med* (2015) **21**: 81-85. doi: 10.1038/nm.3773
37. Mennonna, D., Maccalli, C., Romano, M.C., Garavaglia, C., Capocefalo, F., Bordoni, R., Severgnini, M., De Bellis, G., Sidney, J., Sette, A., et al. T Cell Neoepitope Discovery in Colorectal Cancer by High Throughput Profiling of Somatic Mutations in Expressed Genes. *Gut* (2017) **66**: 454-63. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309453
38. Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. Neoantigens in Cancer Immunotherapy. *Science* (2015) **348**: 69-74. doi: 10.1126/science.aaa4971
39. Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P.F., Lu, Y.-C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Somerville, R.P., Hogan, K., Hinrichs, C.S., et al. Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4⁺ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Science* (2014) **344**: 641-45. doi: 10.1126/science.1251102
40. Ott, P.A., Hu, Z., Keskin, D.B., Shukla, S.A., Sun, J., Bozym, D.J., Zhang, W., Luoma, A., Giobbie-Hurder, A., Peter, L., et al. An Immunogenic Personal Neoantigen Vaccine for Patients with Melanoma. *Nature* (2017) **547**: 217-21. doi: 10.1038/nature22991
41. Drylewicz, J., Schellens, I.M.M., Gaiser, R., Nanlohy, N.M., Quakkelaar, E.D., Otten, H., van Dorp, S., Jacobi, R., Ran, L., Spijkers, S., et al. Rapid Reconstitution of CD4 T Cells and NK Cells Protects against CMV-Reactivation after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Transl Med* (2016) **14**: 230. doi: 10.1186/s12967-016-0988-4

42. Leen, A.M., Heslop, H.E., and Brenner, M.K. Antiviral T-Cell Therapy. *Immunol Rev* (2014) **258**: 12-29. doi: 10.1111/imr.12138
43. Bollard, C.M., and Heslop, H.E. T cells for viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Blood* (2016) **127**: 3331-40. doi: 10.1182/blood-2016-01-628982
44. Lin, R., and Liu, Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol* (2013) **6**: 94. doi: 10.1186/1756-8722-6-94
45. Gerdemann, U., Keirnan, J.M., Katari, U.L., Yanagisawa, R., Christin, A.S., Huye, L.E., Perna, S.K., Ennamuri, S., Gottschalk, S., Brenner, M.K., et al. Rapidly Generated Multivirus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes for the Prophylaxis and Treatment of Viral Infections. *Mol Ther* (2012) **20**: 1622-32. doi: 10.1038/mt.2012.130
46. Tzannou, I., Papadopoulou, A., Naik, S., Leung, K., Martinez, C.A., Ramos, C.A., Carrum, G., Sasa, G., Lulla, P., Watanabe, A., et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol* (2017) **35**: 3547-57. doi: 10.1200/JCO.2017.73.0655
47. Brunstein, C.G., Miller, J.S., McKenna, D.H., Hippen, K.L., DeFor, T.E., Sumstad, D., Curtsinger, J., Verneris, M.R., MacMillan, M.L., Levine, B.L., et al. Umbilical Cord Blood-Derived T Regulatory Cells to Prevent GVHD: Kinetics, Toxicity Profile, and Clinical Effect. *Blood* (2016) **127**: 1044-51. doi: 10.1182/blood-2015-06-653667
48. Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszek, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J., and Hellmann, A. First-in-Man Clinical Results of the Treatment of Patients with Graft versus Host Disease with Human Ex Vivo Expanded CD4+CD25+CD127- T Regulatory Cells. *Clin Immunol* (2009) **133**: 22-26. doi: 10.1016/j.clim.2009.06.001
49. Zhang, H., Podojil, J.R., Chang, J., Luo, X., and Miller, S.D. TGF-Beta-Induced Myelin Peptide-Specific Regulatory T Cells Mediate Antigen-Specific Suppression of Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* (2010) **184**: 6629-36. doi: 10.4049/jimmunol.0904044
50. Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. In Vitro-expanded Antigen-specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med* (2004) **199**: 1455-65. doi: 10.1084/jem.20040139

51. Boardman, D.A., Philippeos, C., Fruhwirth, G.O., Ibrahim, M. a. A., Hannen, R.F., Cooper, D., Marelli-Berg, F.M., Watt, F.M., Lechler, R.I., Maher, J., et al. Expression of a Chimeric Antigen Receptor Specific for Donor HLA Class I Enhances the Potency of Human Regulatory T Cells in Preventing Human Skin Transplant Rejection. *Am J Transplant* (2017) **17**: 931-43. doi: 10.1111/ajt.14185
52. MacDonald, K.G., Hoeppli, R.E., Huang, Q., Gillies, J., Luciani, D.S., Orban, P.C., Broady, R., and Levings, M.K. Alloantigen-Specific Regulatory T Cells Generated with a Chimeric Antigen Receptor. *J Clin Invest* (2016) **126**: 1413-24. doi: 10.1172/JCI82771
53. da Silva Simoneti, G., Saad, S.T.O., and Gilli, S.C.O. An Efficient Protocol for the Generation of Monocyte Derived Dendritic Cells Using Serum-Free Media for Clinical Applications in Post Remission AML Patients. *Ann Clin Lab Sci* (2014) **44**: 180-88.
54. Butler, M.O., Ansén, S., Tanaka, M., Imataki, O., Berezovskaya, A., Mooney, M.M., Metzler, G., Milstein, M.I., Nadler, L.M., and Hirano, N. A Panel of Human Cell-Based Artificial APC Enables the Expansion of Long-Lived Antigen-Specific CD4⁺ T Cells Restricted by Prevalent HLA-DR Alleles. *Int Immunol* (2010) **22**: 863-73. doi: 10.1093/intimm/dxq440
55. Tanaka, M., Butler, M.O., Ansén, S., Imataki, O., Berezovskaya, A., Nadler, L.M., and Hirano, N. Induction of HLA-DP4-Restricted Anti-Survivin Th1 and Th2 Responses Using an Artificial Antigen-Presenting Cell. *Clin Cancer Res* (2011) **17**: 5392. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3083
56. Latouche, J.B., and Sadelain, M. Induction of Human Cytotoxic T Lymphocytes by Artificial Antigen-Presenting Cells. *Nat Biotechnol* (2000) **18**: 405-9. doi: 10.1038/74455
57. Maby, P., Tougeron, D., Hamieh, M., Mlecnik, B., Kora, H., Bindea, G., Angell, H.K., Fredriksen, T., Elie, N., Fauquembergue, E., et al. Correlation between Density of CD8⁺ T-Cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res* (2015) **75**: 3446-55. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3051
58. Papanicolaou, G.A., Latouche, J.-B., Tan, C., Dupont, J., Stiles, J., Pamer, E.G., and Sadelain, M. Rapid Expansion of Cytomegalovirus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes by Artificial Antigen-Presenting Cells Expressing a Single HLA Allele. *Blood* (2003) **102**: 2498-2505. doi: 10.1182/blood-2003-02-0345

59. Garnier, A., Hamieh, M., Drouet, A., Leprince, J., Vivien, D., Frébourg, T., Le Mauff, B., Latouche, J.-B., and Toutirais, O. Artificial Antigen Presenting Cells Expressing HLA Class II Molecules as an Effective Tool for Amplifying Human Specific Memory CD4⁺ T Cells. *Immunol Cell Biol* (2016). doi: 10.1038/icb.2016.25
60. Butler, M.O., and Hirano, N. Human Cell-Based Artificial Antigen-Presenting Cells for Cancer Immunotherapy. *Immunol Rev* (2014) **257**: 191-209. doi: 10.1111/imr.12129
61. Miller, M.A., Ganesan, A.P.V., and Eisenlohr, L.C. Toward a Network Model of MHC Class II-Restricted Antigen Processing. *Front Immunol* (2013) **4**: 464. doi: 10.3389/fimmu.2013.00464
62. Miller, M.A., Ganesan, A.P.V., Luckashenak, N., Mendonca, M., and Eisenlohr, L.C. Endogenous Antigen Processing Drives the Primary CD4⁺ T Cell Response to Influenza. *Nat Med* (2015) **21**: 1216-22. doi: 10.1038/nm.3958
63. van Oosterwijk, M.F., Juwana, H., Arens, R., Tesselaar, K., van Oers, M.H.J., Eldering, E., and van Lier, R.A.W. CD27-CD70 Interactions Sensitise Naive CD4⁺ T Cells for IL-12-Induced Th1 Cell Development. *Int Immunol* (2007) **19**: 713-18. doi: 10.1093/intimm/dxm033
64. Cannons, J.L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M.A., Yagita, H., Okumura, K., and Watts, T.H. 4-1BB Ligand Induces Cell Division, Sustains Survival, and Enhances Effector Function of CD4 and CD8 T Cells with Similar Efficacy. *J Immunol* (2001) **167**: 1313-24.
65. Wen, T., Bukczynski, J., and Watts, T.H. 4-1BB Ligand-Mediated Costimulation of Human T Cells Induces CD4 and CD8 T Cell Expansion, Cytokine Production, and the Development of Cytolytic Effector Function. *J Immunol* (2002) **168**: 4897-4906.
66. Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. PD-L1 Regulates the Development, Maintenance, and Function of Induced Regulatory T Cells. *J Exp Med* (2009) **206**: 3015-29. doi: 10.1084/jem.20090847
67. Wang, L., Pino-Lagos, K., de Vries, V.C., Guleria, I., Sayegh, M.H., and Noelle, R.J. Programmed Death 1 Ligand Signaling Regulates the Generation of Adaptive Foxp3⁺CD4⁺ Regulatory T Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2008) **105**: 9331-36. doi: 10.1073/pnas.0710441105
68. Gilardin, L., Delignat, S., Peyron, I., Ing, M., Lone, Y.-C., Gangadharan, B., Michard, B., Kherabi, Y., Sharma, M., Pashov, A., et al. The ADAMTS131239-1253 Peptide Is a Dominant HLA-DR1-Restricted CD4⁺ T-Cell Epitope. *Haematologica* (2017) **102**: 1833-41. doi: 10.3324/haematol.2015.136671

- 69.** Sallusto, F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Ann Rev Immunol* (2016) **34**: 317-34. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112056
- 70.** Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., et al. Correction of Junctional Epidermolysis Bullosa by Transplantation of Genetically Modified Epidermal Stem Cells. *Nat Med* (2006) **12**: 1397-1402. doi: 10.1038/nm1504
- 71.** Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Amemiya, T., Kanamura, N., and Kinoshita, S. Transplantation of Cultivated Autologous Oral Mucosal Epithelial Cells in Patients with Severe Ocular Surface Disorders. *Br J Ophthalmol* (2004) **88**: 1280-84. doi: 10.1136/bjo.2003.038497
- 72.** Smith, B.D., Kasamon, Y.L., Kowalski, J., Gocke, C., Murphy, K., Miller, C.B., Garrett-Mayer, E., Tsai, H.-L., Qin, L., Chia, C., et al. K562/GM-CSF Immunotherapy Reduces Tumor Burden in Chronic Myeloid Leukemia Patients with Residual Disease on Imatinib Mesylate. *Clin Cancer Res* (2010) **16**: 338-47. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2046

Name of CD4+ T lymphocytes subsets	Principal soluble factors involved in differentiation	Transcription factors	Principal soluble factors production	Principal roles and functions
Th1	IFN- γ , IL-12	T-bet	IFN- γ , TNF- α	Intracellular immunity
Th2	IL-4	GATA3	IL-4, IL-5, IL-13	Allergy, extracellular immunity
Th9	TGF- β , IL-4	PU.1	IL-9	Parasite immunity, skin response
Th17	TGF- β , IL-6, IL-23	ROR γ t	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22	Autoimmunity, inflammation
CD4 CTL	IL-2, IL-15	Eomes	Granzyme B, Perforin	Killing
Tfh	IL-6, IL-21	Bcl6	IL-21	B cell help
iTreg	TGF- β , IL-2	Foxp3	TGF- β , IL-10	Tolerance, suppression

Table 1

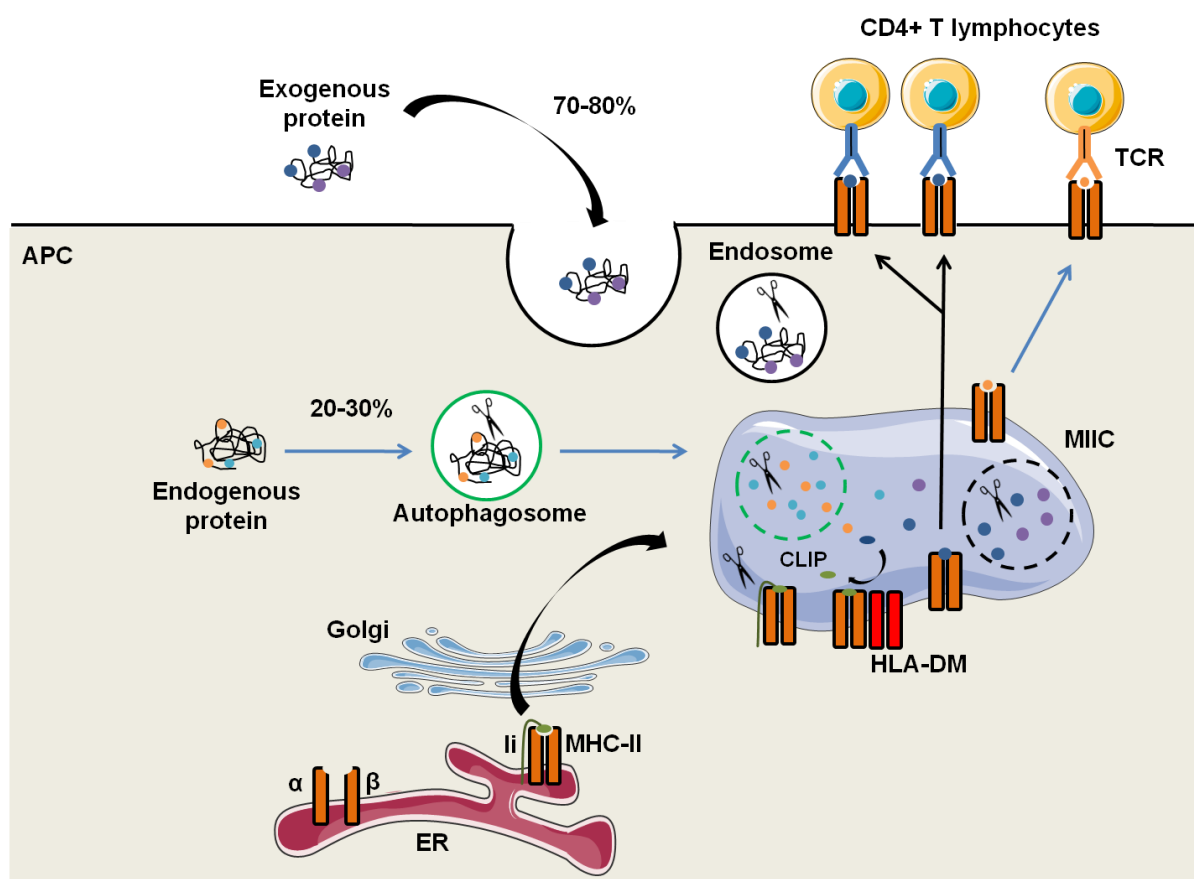


Figure 1

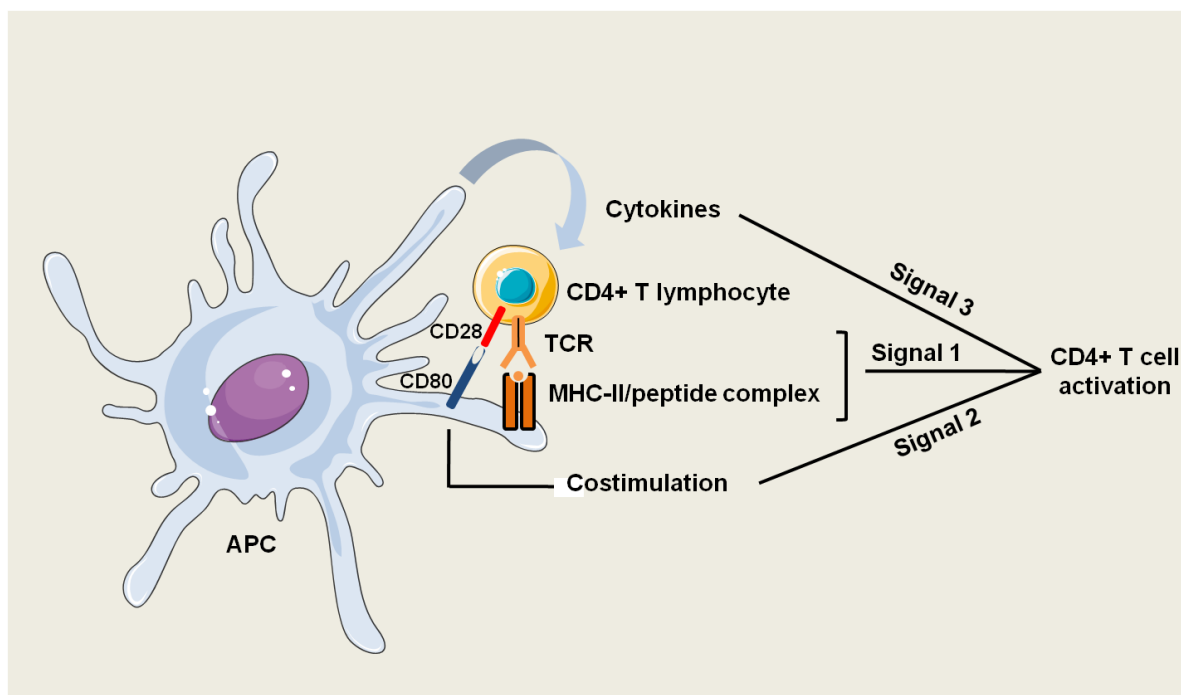


Figure 2

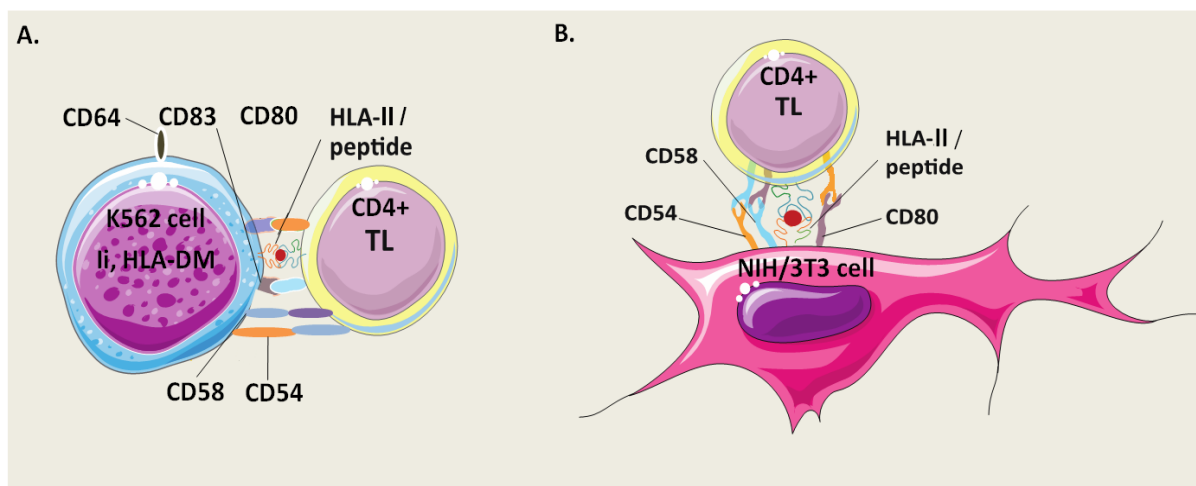


Figure 3

Table 1: Soluble factors involved in the main CD4⁺ TLs subsets differentiation: their transcriptional factors, soluble factors productions and functions.

Th: helper T cell, CTL: cytotoxic T lymphocyte, Tfh: follicular helper T cell, iTreg: induced regulatory T cell, IFN- γ : interferon-gamma, IL: interleukin, TGF- β : tumor growth factor-beta, T-bet: T-box expressed in T cells, GATA3: GATA binding protein 3, ROR γ t: retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor gamma t (thymus), Eomes: eomesodermin, Bcl6: B-cell lymphoma 6, Foxp3: forkhead box P3, TNF- α : tumor necrosis factor-alpha.

Figure 1: The MHC-II antigen presentation pathways.

Major histocompatibility complex class II (MHC-II) α and β chains form a heterotrimer in the endoplasmic reticulum (ER) with the invariant chain (Ii). This heterotrimer ($\alpha/\beta/Ii$) can migrate, after maturation by the Golgi apparatus, to the MHC class II compartment (MIIC). In the MIIC, under the action of proteases, endocytosed and endogenous proteins but also Ii are degraded for generating peptides. Ii is progressively degraded and only the part of Ii which is bind to the MHC-II groove, named Class II Invariant chain Peptide (CLIP) will subsist. The chaperone protein HLA-DM allows the excision of the CLIP in order to release the MCH-II groove and allows the fixation of peptides with better affinity. After the formation of peptide/MHC-II complexes, they migrate to the plasma membrane of the antigen presenting cell (APC) and they can interact with T-cell receptors (TCRs) of CD4⁺ T lymphocytes.

Figure 2: The CD4⁺ TLs activation.

Antigen presenting cell (APC) provides the three signals to fully activate a CD4⁺ T lymphocyte (TL). The first signal is mediated by the interaction between the T-Cell Receptor (TCR) of a CD4⁺ TL with the MHC-II/peptide complex at the APC surface. The second signal is mediated by costimulatory molecules, like CD80 located on APC which interacts with CD28 on a TL. The third signal is brings by soluble factors including cytokines, which are secreted notably by the APC. Combination of these three signals is necessary for an optimal CD4⁺ TLs activation.

Figure 3: Models of HLA-II-AAPCs for amplifying human antigen-specific CD4⁺ TLs.

A. Model of artificial antigen presenting cell (AAPC) based on erythroleukemic K562 cell line. K562-AAPCs express the invariant chain (Ii), HLA-DM, CD54, CD58, CD64, CD80, CD83 and one HLA class II (HLA-II) molecule. **B.** Model of AAPC based on mouse fibroblast NIH/3T3. NIH/3T3-AAPCs express CD54, CD58, CD80 and one HLA-II molecule.

RESUME

Les lymphocytes T (LT) CD4⁺ auxiliaires soutiennent l'action des LT CD8⁺ cytotoxiques (LTC) au cours des réponses immunitaires anti-tumorales. Des protocoles d'immunothérapie cellulaire adoptive (ICA) basés sur l'injection d'effecteurs T CD4⁺ ont donc été développés pour traiter les cancers, et ils ont montré une efficacité thérapeutique. Cependant, la difficulté de disposer de cellules présentatrices d'antigène (CPA) autologues permettant de générer un nombre suffisant de LT CD4⁺ spécifiques fonctionnels *in vitro* dans un court délai représente un obstacle majeur au développement de telles approches.

Pour contourner cette difficulté, notre groupe a précédemment développé des cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) dérivant de fibroblastes murins NIH/3T3 et exprimant les molécules nécessaires pour activer des LT CD4⁺ humains : une molécule HLA (*Human Leucocyte Antigen*) de classe II (ici HLA-DR1), la molécule de costimulation CD80 et les molécules d'adhérence CD54 et CD58.

Dans ce travail, nous avons cherché à optimiser nos CPAA DR1⁺ (CPAA^{DR1}) en permettant une expression endogène et constitutive de l'antigène d'intérêt (ici l'hémagglutinine, HA), sous forme de peptide ou de protéine, au niveau des compartiments cellulaires impliqués dans la présentation des antigènes par les molécules HLA-II. Nous avons montré que les CPAA^{DR1} « endogènes » exprimant le peptide HA au niveau du réticulum endoplasmique (RE) ou la protéine HA à la membrane plasmique, possédaient les meilleures capacités de présentation de l'antigène. En stimulation primaire, ces deux lignées de CPAA^{DR1} activaient des LT CD4⁺ spécifiques de HA, mais avec une capacité moindre que des CPA autologues. En revanche, en restimulation, les CPAA^{DR1} exprimant le peptide HA dans le RE étaient même plus efficaces pour amplifier des LT CD4⁺ spécifiques fonctionnels que des CPAA^{DR1} ou des CPA autologues chargées avec le peptide d'intérêt. Les LT obtenus étaient des cellules Th1 mémoires exprimant du granzyme B et produisant de l'IFN- γ et du TNF- α .

C'est la première fois à notre connaissance qu'un antigène exprimé de façon endogène dans une lignée cellulaire peut-être présenté de façon efficace sur une molécule HLA de classe II. Nos CPAA « endogènes » constituent donc un nouvel outil unique pour générer de façon reproductible et standardisable des réponses T CD4⁺ spécifiques, et pourraient déboucher sur le développement de nouvelles approches d'ICA.

Mots clefs : lymphocytes T CD4⁺, présentation de l'antigène, cellules présentatrices d'antigène artificielles, immunothérapie