-Tables des Matières -

Abréviations 1

Résumé 3

Abstract 4

Introduction 5

Partie I : Système immunitaire et cancer 5

I. Les Cancers : caractéristiques, épidémiologie et facteurs de risque 5

II. Les cellules du système immunitaire et les cancers 7

A. Les cellules de la réponse immunitaire innée associées aux tumeurs 7

1. Les neutrophiles 7

2. Les éosinophiles 8

3. Les basophiles 8

4. Les cellules *Natural Killer* (NK) 8

5. Les lymphocytes T non conventionnels NKT 9

6. Les lymphocytes T non conventionnels γδ 9

7. Les cellules myéloïdes suppressives 10

8. Les macrophages 10

9. Les cellules dendritiques 12

B. Les cellules de la réponse immunitaire adaptative associées aux tumeurs 14

1. Les lymphocytes B 15

2. Les lymphocytes Tαβ 15

a. Les lymphocytes T CD4+ 15

b. Les lymphocytes T régulateurs CD4+ 17

c. Les lymphocytes T CD8+ 18

d. Les lymphocytes T CD8+ effecteurs 18

e. Les lymphocytes T souches mémoires CD8+ 20

f. Les lymphocytes T CD8+ comme cellules régulatrices dans le cancer ? 20

III. Présentation des antigènes et activation des lymphocytes T 21

A. Interaction CMH-peptide/TCR (signal 1) 22

1. Présentation des antigènes sur les molécules de CMH 22

2. Les molécules du CMH de classe I 23

a. Les ligands du CMH de classe I 24

b. Rôle important du protéasome dans la génération des ligands du CMH-I 25

c. Rôle de la machinerie TAP et du PLC (*Peptide Loading Complex*) 27

3. Les molécules du CMH de classe II 28
4. La présentation croisée 30
5. Le TCR 31
B. Les molécules accessoires (signal 2) 32
C. Les facteurs solubles (signal 3) 33
IV. Concept de l'*immunoediting* 34
A. Phase d'élimination 35
B. Phase d'équilibre 36
C. Phase d'échappement 37
1. La perte d'antigénicité 37
2. La perte d'immunogénicité 39
3. Le microenvironnement tumoral 39
a. Cellules immunosuppressives 40
b. Cytokines immunosuppressives 41
Partie II : Immunothérapie des cancers 43
I. Immunothérapie passive 44
II. Immunothérapie active 48
A. Immunothérapie active non spécifique d'antigènes tumoraux 48
1. Cytokines immunostimulantes 48
2. Les anticorps monoclonaux immunomodulateurs 48
B. Immunothérapie cellulaire spécifique d'antigènes tumoraux 49
1. Vaccination anti-tumorale 49
a. Injection de cellules dendritiques 49
b. Vaccins à base de protéines, d'ARN ou d'ADN 50
III. Immunothérapie cellulaire adoptive 51
1. Différents types d'immunothérapie cellulaire adoptive 51
2. Stimulation *in vitro* de lymphocytes T « naturellement » anti-tumoraux 55
IV. Systèmes artificiels de présentation d'antigène 55
A. Systèmes acellulaires 56
B. Systèmes cellulaires 56
1. CPAA dérivées de cellules d'insectes 57
2. CPAA dérivées de cellules K562 57
3. CPAA dérivées de fibroblastes murins 57
Partie III : Les antigènes tumoraux 59
I. Les différentes catégories d'antigènes tumoraux 59
A. Les antigènes partagés 59

1. Antigènes de différenciation 59
2. Antigène surexprimés 60
3. Antigènes CT (*Cancer Testis*) ou « antigènes germinaux » 60
B. Les antigènes codés par des gènes viraux ou mutés 60
1. Antigènes viraux 60
2. Antigènes codés par des gènes mutés ou néoantigènes 61
II. Méthodes d'identification des antigènes et des épitopes tumoraux 63
A. Approche génétique 63
B. Approches sérologiques : méthodes de détection d'antigènes tumoraux basées sur l'utilisation d'anticorps 65
C. Méthode de l'« immunologie inverse » : basée sur les prédictions bioinformatiques 66
D. Approches « directes » ou « cellulaires » : méthodes directes d'analyse et d'identification d'épitopes CMH-I restreints 68
1. Méthodes d'analyses qualitatives 68
a. Méthodes d'identification d'épitopes CMH-I restreints basées sur l'utilisation de molécules du CMH solubles 68
b. Elution des peptides CMH restreints exprimés à la surface de cellules viables par un acide faible 68
c. Purification par chromatographie d'affinité des complexes CMH-peptide ... 69
2. Méthodes d'analyses quantitatives 70
Partie IV : Immunothérapie dans les cancers colorectaux 72
I. Les cancers colorectaux 72
A. Instabilité chromosomique 73
B. Instabilité microsatellitaire (IMS) 74
1. Système de réparation des mésappariements de l'ADN 75
a. Fonctionnement 75
b. Inactivation 75
2. Le syndrome de Lynch 76
3. Le CCR sporadique à IMS 77
II. Les néoantigènes tumoraux dans les CCR à IMS : « Frameshift Peptides » (FSP) 77
III. Réponse immunitaire dans les CCR à IMS 79
IV. Approches d'immunothérapie dans les CCR à IMS 82
V. Les cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) développées au laboratoire, utilisées dans le cadre des CCR à IMS 83
Objectifs des travaux 86
Résultats 88

Partie I : caractérisation de peptides immunogènes HLA-A2.1 restreints dans le cadre des cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire 88

I. Mise au point de l'outil de caractérisation des peptides HLA restreints à partir de cellules présentatrices d'antigène artificielles 88

A. Contexte scientifique 88

B. Matériel et méthodes 90

1. Culture cellulaire des cellules NIH/3T3 et des cellules présentatrices d'antigène artificielles 90

2. Vérification du phénotype des cellules présentatrices d'antigène artificielles 90

3. Vérification de la qualité de l'anticorps immunoprécipitant anti-HLA A2 91

4. Extraction protéique des cellules NIH/3T3 et des cellules présentatrices d'antigène artificielles 91

5. Western Blot et immunomarquage de la protéine HLA 92

6. Immunoprécipitation 92

a. Etape de « preclearing » 92

b. Procédure A : incubation de l'extrait protéique avec l'anticorps anti-HLA A2 puis addition des billes de sépharose 93

c. Procédure B : incubation des billes de sépharose / protéine A avec l'anticorps anti-HLA A2 puis addition de l'extrait protéique 93

7. Elution des complexes HLA A2 93

8. Etape d'enrichissement des produits d'immunoprécipitation 95

a. Procédure A : enrichissement des produits d'immunoprécipitation en peptides par ultrafiltration 95

b. Procédure B : enrichissement et nettoyage des immunoprécipitats sur « tips » Omix C18 95

9. Spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide 95

a. Principe de la technologie nano LC-ESI-QTOF 95

b. Analyse nano LC-ESI-Q-TOF des échantillons 97

C. Résultats 98

II. Article I : Highly immunogenic peptides of clinical interest can escape mass spectrometry detection 118

Partie II : Stimulation *in vitro* « personnalisée » de LTC anti-tumoraux, basée sur l'utilisation de CPAA codant des peptides prédits, potentiellement dérivés de néoantigènes spécifiques de la tumeur, chez des patients atteints de CCR à IMS 150

I. Contexte scientifique 150

II. Article II : *CASP5*(-1) frameshift mutation in microsatellite unstable colorectal cancers is associated with less good prognosis, but could be targeted in a specific immunotherapy strategy by efficacious anti-tumor cytotoxic T cells. 153

Discussion 180

Partie I : caractérisation par spectrométrie de masse de néopeptides d'intérêt thérapeutique 181
Partie II : caractérisation de néopeptides d'intérêt thérapeutique à partir de prédictions bioinformatiques 190
Conclusion et perspectives 198
Annexe 1 202
Annexe 2 219
Bibliographie 249

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Index des figures et des tableaux

Figure 1 : Huit caractéristiques des cellules cancéreuses permettant la progression tumorale 6
Figure 2 : Polarisation des macrophages (M1/M2) 11
Figure 3 : La cellule dendritique 13
Figure 4 : Les différentes cellules de l'immunité innée et leur rôle pro ou anti-tumoral. 14
Figure 5 : Mécanismes principaux de destruction des cellules tumorales par les LT effecteurs $CD8^+$ 19
Figure 6 : Les différentes cellules de l'immunité adaptative et leur rôle pro ou anti-tumoral 21
Figure 7 : Présentation de l'antigène tumoral dans la synapse immunologique 22
Figure 8 : Structure tridimensionnelle d'une molécule HLA-I 24
Figure 9 : Sous unités du protéasome constitutif et de l'immunoprotéasome 27
Figure 10 : Présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I 28
Figure 11 : Structure tridimensionnelle d'une molécule HLA-II 30
Figure 12 : Représentation du T Cell Receptor (TCR) 32
Figure 13 : Capacité anti-tumorale au cours de la différenciation progressive des lymphocytes T 54
Figure 14 : Exemples de systèmes de présentation d'antigène artificiels 58
Figure 15 : Les antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques 62
Figure 16 : Fonctionnement du système MMR (*Mismatch Repair System*) 76
Figure 17 : Mutation par décalage du cadre de lecture - exemple du gène du récepteur du TGFβ de type II (TGFβRII) 79
Figure 18 : Cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) 85
Figure 19 : Résumé des grandes étapes de l'élution de peptide 89
Figure 20 : Résumé global de la procédure de purification des complexes HLA A2.1 94
Figure 21 : Vérification de la qualité de l'anticorps immunoprécipitant anti-HLA-A2.1 (clone BB7.2) 99
Figure 22 : Western Blot avec l'anticorps anti-HLA A, B et C dirigé contre les chaînes lourdes A, B et C des molécules HLA de classe I 100
Figure 23 : Comparaison de l'efficacité des tampons RIPA et Abcam 102
Figure 24 : Meilleur ratio anticorps/extrait protéique 103
Figure 25 : Capacité d'élution du tampon de charge 104
Figure 26 : Choix de la procédure d'immunoprécipitation 105
Figure 27 : Capacité d'élution de l'acide trifluoroacétique (TFA) 106
Figure 28 : Evaluation du seuil de détection des peptides FSP02 et M1 par spectrométrie de masse 107
Figure 29 : Identification des peptides M1 et FSP02 : séquençage des ions 814.50 (1+) et 466.25 (2+). 108
Figure 30 : Evaluation de la perte des peptides M1 et FSP02 après passage sur filtre Amicon ultracel YM-10 109
Figure 31 : Première analyse des immunoprécipitats des $CPAA^{A2.1/M1}$ et des $CPAA^{A2.1/FSP02}$ par LC-Q-TOF 110
Figure 32 : Analyse d'une quantité plus importante des immunoprécipitats des $CPAA^{A2.1/M1}$ par LC Q TOF 111
Figure 33 : Evaluation de la perte lors d'enrichissement par colonne « tips » OMIX C18 112
Figure 34 : Détection du peptide M1 par LC-QTOF 113
Figure 35 : Dosage du peptide M1 par analyse des immunoprécipitats sur le système LC-Triple Quad 114
Figure 36 : Validation de l'anticorps purifié pour l'immunoprécipitation des complexes HLA-A2.1 115

Tableau 1 : Anticorps monoclonaux utilisés dans le cadre d'une immunothérapie passive et approuvés par la *FDA* (*Food and Drug Administration*)..... 47
Tableau 2 : Immunothérapie active actuellement approuvée par différentes agences de régulation dans le monde. D'après Galluzzi et al, Oncotarget, Vol.5, No. 24 (2015)..... 51
Tableau 3 : Algorithmes de prédiction d'antigène..... 67
Tableau 4 : Classification moléculaire des cancers colorectaux d'après la présentation de Rodrigo Dienstmann, ASCO 2014..... 73
Tableau 5 : Résumé des grandes étapes de mise au point du protocole d'élution de peptides HLA-A2.1-restreints à partir des cellules présentatrices d'antigène artificielles..... 117

Rapport-Gratuit.com

- Abréviations -

ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire

AcM : Anticorps Monoclonaux

ACN : Acétonitrile

ADCC : *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*

AF : Acide Formique

AFP : Alpha Foetoprotéine

BCR : *B Cell Receptor*

Be1 : *B effector1*

Be2 : *B effector2*

BiTEs : *Bispecific T-cell Engagers*

Breg : Lymphocytes B régulateurs

CAR : *Chimeric Antigen Receptor*

CCR : Cancer Colorectal

CD : *Cluster of Differentiation*

cDC : *classical Dendritic Cell, conventional Dendritic cell*

CHOP : *Cellular stress sensor C/EBP-Homologous Protein*

CLIP : *Class II-associated Invariant chain Peptide*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMS : *Consensus Molecular Subtypes*

CMV : *Cytomegalovirus*

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène

CPAA : Cellules Présentatrices d'Antigène Artificielles

CT : *Cancer Testis*

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

DCS : *Donor Calf Serum*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DTT : *Dithiothreitol*

EBV : *Epstein-Barr Virus*

ECL : *Enhanced Chemiluminescence*

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

EMA : *European Medecines Agency*

EpCAM : *Epithelial Cell Adhesion Molecule*

ESI : *Electrospray Ionisation*

FAP : *Familial Adenomatous Polyposis*

FDA : *Food and Drug Administration*

FITC : *Fluoresceine Iso-Thyo-Cyanate*

FMP : *Flu Matrix Protein*

FSP : *Frameshift Peptide*

G-CSF : *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

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

Her2/Neu : *Human epidermal receptor 2/Neurological*

HLA-A*02:01 ou HLA-A2.1 : *Human Leucocyte Antigen*

HNPCC : *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*

HPV : *Human Papilloma Virus*

hTERT : *human Telomerase Reverse Transcriptase*

IC : Instabilité Chromosomique

ICA : Immunothérapie Cellulaire Adoptive

ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule-1*

ICAT : *Isotope-Coded Affinity Tags*

IDO : Indoléamine 2,3 Dioxygénase

IFNβ : Interféron β

IFNγ : Interféron γ

Ii : *Invariant chain*

IL : Interleukine

IMS : Instabilité Microsatellitaire

iNKT : *invariant NKT*

IRES : *Internal Ribosome Entry Site*

KIR : *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*

LAG-3 : *Lymphocyte-Activation Gene-3*

LB: Lymphocyte B

LFA-3 : *Lymphocyte function-associated antigen-3*

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

LTC : Lymphocyte T Cytotoxique

LTreg : LT régulateur

MAGE-1 : *Melanoma-associated Antigen-1*

MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*

MART-1 : *Melanoma Antigen Recognized by T-cells-1*

MCA : Méthylcholanthrène

MCAT : *Mass-Coded Abundance Tagging*

mDC : *myeloid Dendritic Cell*

MDSC : *Myeloid-Derived Suppressor Cell*

MMR *: DNA Mismatch Repair system*

MS : *Mass Spectrometry*

MSS : Microsatellite Stable

MVBs : *Multivesicular Bodies*

NGS : *Next Generation Sequencing*

NK : *Natural Killer*

NKT : *Natural Killer T cell*

NY-ESO-1 : *New York Esophageal squamous cell carcinoma-1*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PBS : *Phosphate Buffer Saline*

PD-1 : *Programmed cell Death protein-1*

pDC : *plasmacytoid Dendritic Cell*

PE : *Phyco-Erythrin*

PLC : *Peptide Loading Complex*

PSA : *Prostate Specific Antigen*

RE : Réticulum Endoplasmique

RIPA : *Radio Immunoprecipitation Assay*

RNS : *Reactive Nitrogen Species*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

scFv : *single-chain Fragment variable*

SEREX : *Serological identification of antigens by Recombinant Expression cloning*

SILAC : *Stable Isotope Labeling in Cell culture*

TAP : *Transporter associated with Antigen Presentation*

T_{CM} *: Central Memory T cell*

TCR : *T Cell Receptor*

T_{EM} : *Effector Memory T cell*

TFA : *Trifluoroacetic acid*

Tfh : *follicular helper T cell*

TGFβ : *Transforming Growth Factor β*

Th : *helper T cell*

TIL : *Tumor Infiltrating Lymphocyte*

TLR : *Toll-Like Receptor*

TNFRSF10B : *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10B*

TNFα : *Tumor Necrosis Factor α*

TOF : *Time Of Flight*

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

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

- Résumé -

L'immunothérapie représente une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de cancer. L'utilisation thérapeutique récente des anticorps anti-"checkpoints", qui renforcent la réponse immunitaire cellulaire naturelle anti-tumorale, a relancé l'intérêt d'approches d'immunothérapie cellulaire spécifique dans les cancers. Malgré tout, l'identification d'antigènes capables de stimuler efficacement des lymphocytes T (LT) anti-tumoraux représente un obstacle majeur au développement de telles approches. Pour identifier de tels antigènes, des cellules présentatrices d'antigène (CPA) artificielles (CPAA), capables d'exprimer, après transduction gamma-rétrovirale, des peptides directement codés ou des antigènes entiers, dégradés par ces cellules, comme le feraient des CPA humaines, en peptides présentés au sein de la molécule du CMH de classe I la plus fréquente chez l'homme, HLA-A2.1, ont été développées au laboratoire. Ces CPAA sont capables de stimuler efficacement des LT cytotoxiques (LTC) spécifiques contre des antigènes tumoraux. Deux grandes approches d'identification des antigènes tumoraux d'intérêt thérapeutique, ont été utilisées. La première est une approche directe d'identification des peptides basée sur l'élution des peptides HLA-A2.1-restreints présentés par nos CPAA et leur analyse par spectrométrie de masse. La seconde est une approche d'immunologie inverse basée sur des prédictions *in silico* d'épitopes HLA-A2.1-restreints reposant sur des données biochimiques des poches du CMH. Dans les deux approches, des tests fonctionnels d'activation de LTC spécifiques ont été effectués avec nos CPAA.

Dans la première étude, nous avons utilisé la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide, qui a été jusqu'à présent la technologie permettant l'identification rapide de centaines de ligands du CMH dans différentes approches expérimentales. En partant de CPAA codant les peptides immunogènes connus M1m, M1 ou FSP02, des LTC spécifiques de ces peptides ont été obtenus, et nous avons réussi à les caractériser par spectrométrie de masse. En partant de CPAA codant les protéines entières desquelles ces peptides sont dérivés, des LTC spécifiques des peptides ont également été obtenus mais nous n'avons pas réussi à les caractériser par spectrométrie de masse. Des peptides très immunogènes, capables de stimuler de fortes réponses immunitaires cellulaires anti-tumorales, peuvent donc échapper à une détection par spectrométrie de masse, rendant ainsi discutable l'utilisation de cette technique pour sélectionner des peptides d'intérêt clinique.

Dans la deuxième étude, nous sommes partis de peptides prédits. Nous avons pu monter des réponses immunitaires spécifiques contre les néoépitopes FSP25 et FSP26 prédits *in silico*, dérivés de la protéine mutée CASP5 (-1) retrouvée chez 60% de patients atteints de cancer colorectal (CCR) à instabilité microsatellitaire (IMS). La CASP5 est impliquée dans l'apoptose et nous avons montré que les patients atteints d'un CCR à IMS présentant cette mutation avaient un moins bon pronostic. Nous avons également montré que chez des patients HLA-$A2^+$ atteints d'un CCR à IMS présentant la mutation, des LTC pouvaient être obtenus contre les épitopes FSP25 et FSP26, capables de lyser spécifiquement la lignée cellulaire HLA-$A2.1^+$ HCT116 dérivée d'un CCR à IMS présentant également la mutation, faisant de la protéine mutée CASP5 (-1) une cible thérapeutique de choix chez ces patients.

Dans ces deux études, nos CPAA constituaient un outil de choix pour le développement d'approches d'immunothérapie spécifique personnalisée, soit cellulaire adoptive, pour déterminer quels antigènes devraient être ciblés ou pour directement activer et amplifier *in vitro* des LT injectés *in vivo*, soit vaccinale, pour déterminer les antigènes les plus immunogènes à inclure dans un vaccin efficace.

- Abstract -

Immunotherapy represents a major advance in cancer patient management. Recent use of anti-checkpoint antibodies, that reinforce the natural cellular anti-tumor immune response, has revived interest for specific cellular immunotherapy approaches in cancers. Nevertheless, the difficulty of identifying highly immunogenic tumor antigens capable of specifically stimulating efficient anti-tumor T lymphocytes (TLs) is a considerable barrier to the development of such approaches. In order to identify such antigens, artificial antigen presenting cells (AAPCs) expressing the most common HLA class I molecule, HLA-A2.1, were developed in the laboratory. After gammaretroviral transduction, these AAPCs also express a directly-encoded peptide of interest or a full-length antigen, degraded by these cells into peptides as human antigen presenting cells (APCs) do. These AAPCs are capable of efficiently stimulating specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against tumor antigens. Two major approaches for the identification of tumor antigens of therapeutic interest have been used. The first one is a direct approach of identification of HLA-A2.1-restricted peptides based on the elution of HLA-A2.1-peptide complexes expressed by our AAPCs and their analysis by mass spectrometry. The second one is a reverse immunology approach based on *in silico* predictions of HLA-A2.1-restricted epitopes using available MHC pocket biochemical data. In both approaches, functional tests were performed *in vitro* with our AAPCs to test the immunogenicity of the studied peptides.

In the first study, we used tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography, which has been until today the technology of choice for the rapid identification of hundreds of MHC ligands in different experimental approaches. Starting from AAPCs encoding known immunogenic M1m, M1 and FSP02 peptides, specific CTLs could be obtained against these peptides, and we were able to characterize them by mass spectrometry. Starting from AAPCs encoding full length antigens from which these peptides are derived, peptide-specific CTLs were also obtained, but we were unable to characterize them by mass spectrometry. Therefore, highly immunogenic peptides, capable of stimulating strong anti-tumor cellular immune responses, may not be detected by mass spectrometry, rendering questionable the use of this technique for selecting clinically relevant peptides.

In the second study, we started from predicted peptides. We were able to mount specific immune responses against FSP25 and FSP26 *in silico* predicted neoepitopes, derived from the CASP5 (-1) mutated protein found in 60% of microsatellite instability (MSI) colorectal cancer (CCR) patients. CASP5 is involved in programmed cell death and we have shown that MSI CRC patients whose tumors harbored this *CASP5* (-1) mutation had less good prognosis. We have also shown that in HLA-$A2^+$ MSI *CASP5* (-1)-mutated CRC patients, specific CTLs could be obtained against FSP25 and FSP26 epitopes, capable of specifically lysing HLA-$A2^+$ MSI CRC cell line HCT116 also harboring this mutation. Therefore, the mutated caspase-5 protein might be a therapeutic target of major interest for personalized specific immunotherapy strategies in the context of MSI *CASP5* (-1)-mutated CRCs.

In both studies, our AAPCs were a tool of choice for the development of personalized specific immunotherapy strategies, either for cellular adoptive approaches, to determine which antigens should be targeted or to directly activate and amplify *in vitro* antigen of interest-specific TLs which would be transferred *in vivo*, or for vaccine approaches, to identify the most immunogenic antigens which should be included in an efficacious vaccine.

- Introduction -

Partie I : Système immunitaire et cancer

I. Les Cancers : caractéristiques, épidémiologie et facteurs de risque

Le cancer est un problème majeur de santé publique. Plus de 14.1 millions[1] de nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués dans le monde chaque année, dont 385 000 estimés en 2015 en France métropolitaine[2]. Le cancer représente une des causes majeures de décès dans le monde avec 8.2 millions de décès par an. Selon les estimations réalisées en 2011 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer provoque désormais plus de décès que les pathologies cardiovasculaires en général[3]. En France, malgré les multiples avancées dans sa prise en charge, le cancer reste encore la première cause de décès avec près de 150 000 morts estimées en 2015[2].

Le cancer est dû à diverses altérations génétiques, entraînant la transformation progressive des cellules saines en tumeur maligne. Le cancer se développe en plusieurs étapes au cours desquelles les cellules cancéreuses accumulent des défauts dans les différentes voies physiologiques régulant la prolifération cellulaire normale et l'homéostasie. Il existe un grand nombre de facteurs de risque pouvant favoriser le développement d'un cancer. Parmi ces facteurs on peut citer les facteurs environnementaux tels que le tabac, l'alcool, les facteurs nutritionnels (alimentation déséquilibrée, surcharge pondérale ou consommation excessive de certains aliments), la sédentarité, les agents infectieux et les différents facteurs de prédisposition génétique aux cancers. L'exposition à l'un ou plusieurs de ces facteurs de risque ne conduit pas systématiquement au développement d'un cancer chez tous les individus.

En 2000, six étapes distinctes et communes à la plupart des tumeurs humaines ont été décrites comme les caractéristiques principales permettant le développement d'un cancer. Ces caractéristiques sont les suivantes : l'autosuffisance vis-à-vis de signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, la résistance à l'apoptose, un potentiel réplicatif illimité, une angiogenèse soutenue et une capacité à envahir les tissus et à former des métastases (Figure 1)[4]. En 2011, deux autres caractéristiques ont été ajoutées à cette liste : la

reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire[5]. Souligner l'importance de la composante immunitaire n'est pas anodine, d'autant plus que l'utilisation du système immunitaire pour reconnaître et détruire les cellules tumorales est maintenant devenue l'une des pierres angulaires du traitement du cancer. En dehors de la chirurgie, la plupart des patients reçoivent une chimiothérapie ou une radiothérapie pour prévenir les rechutes et les métastases tumorales. Ces traitements peuvent être accompagnés d'une toxicité à long terme. Depuis quelques décennies, l'immunothérapie du cancer a révélé une grande efficacité dans certains types de cancers tels que le mélanome[6,7]. La compréhension de la réponse immunitaire naturelle des patients atteints de cancer est donc d'une importance majeure pour le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie.

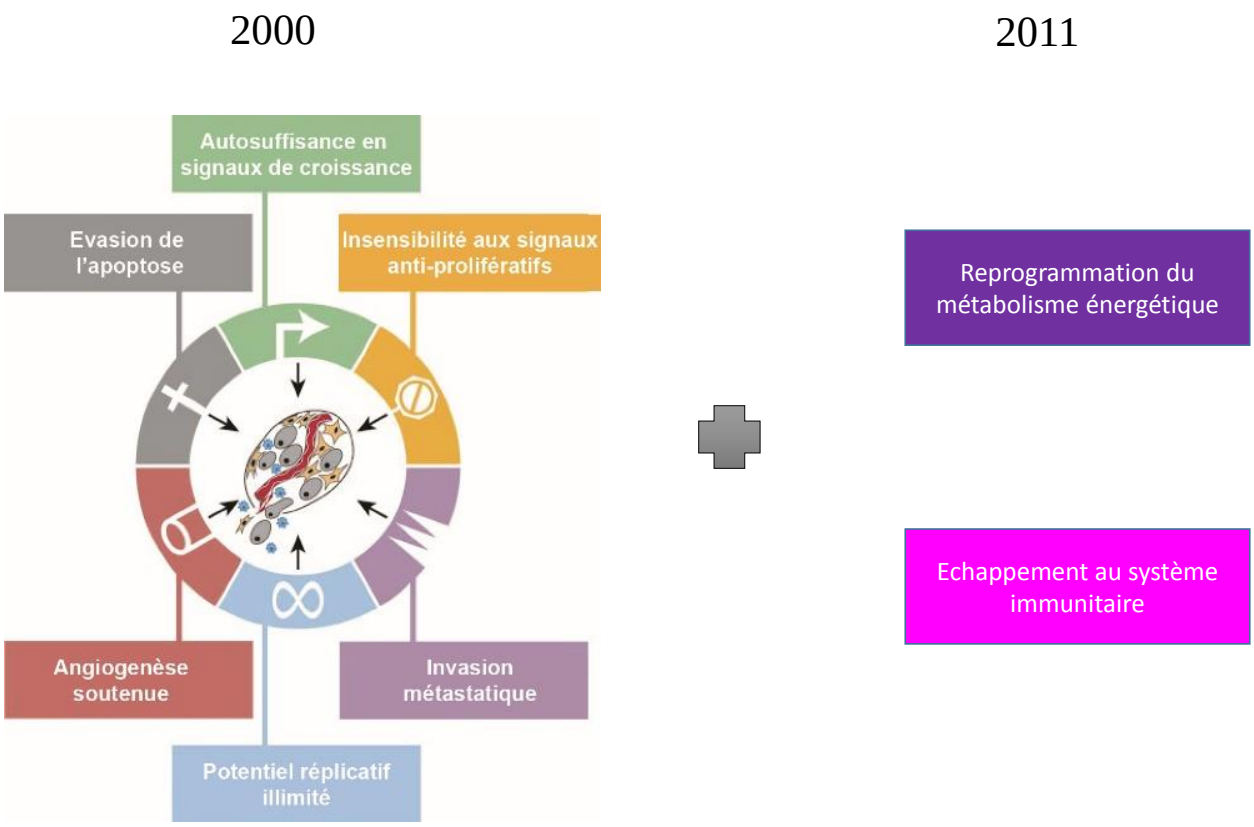


Figure 1 : Huit caractéristiques des cellules cancéreuses permettant la progression tumorale

De nombreux facteurs contribuent à la transformation progressive des cellules saines en cellules cancéreuses. En 2000, les caractéristiques conférant un avantage prolifératif à la tumeur ont été classées en six catégories principales : les six « hallmarks » des cancers. Et en 2011, deux autres caractéristiques ont été ajoutées à cette liste : la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire. D'après Hanahan, D. et Weinberg, R. A. Cell 100, 57-70 (2000) et Cell 144(5):646 -74 (2011)

II. Les cellules du système immunitaire et les cancers

Le système immunitaire interagit étroitement avec les tumeurs tout au long du processus développemental de la maladie jusqu'à sa progression métastatique. Ces interactions assez complexes entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales peuvent ainsi inhiber ou améliorer la croissance de la tumeur. L'immunité innée et l'immunité adaptative jouent un rôle dans les effets anti- ou pro-tumoraux du système immunitaire. Les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les cellules dendritiques matures, les macrophages M1, les granulocytes, les lymphocytes B (LB), les lymphocytes T (LT) αβ et γδ, les cellules NKT (*Natural Killer T*) et les cellules NK (*Natural Killer*) peuvent être impliqués dans la réponse immunitaire anti-tumorale. A l'inverse, les cellules dendritiques tolérogènes, les macrophages M2, les cellules myéloïdes suppressives ou MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*), les LT régulateurs et les cellules B régulatrices sont capables de supprimer les réponses immunitaires anti-tumorales. Dans cette partie nous allons brièvement décrire les différents types cellulaires de l'immunité innée et adaptative infiltrant les tumeurs et leurs rôles anti- et/ou pro-tumoraux.

A. Les cellules de la réponse immunitaire innée associées aux tumeurs

Le système immunitaire inné est composé de différentes cellules, qui sont capables d'infiltrer les tumeurs et d'exercer soit des actions anti-tumorales grâce l'initiation de réponses humorales ou cellulaires dirigées contre les tumeurs ou soit des actions pro-tumorales grâce à divers mécanismes anti-inflammatoires.

1. Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent une importante population leucocytaire ayant la capacité d'infiltrer plusieurs types de tumeurs. Il existe deux sous-types de neutrophiles associés aux tumeurs : le sous-type N1, induit en présence de G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) et d'interféron β (IFN-β), et le sous-type N2, induit en présence de TGF-β (*Transforming Growth Factor β*) et d'interleukine 8 (IL-8). Les neutrophiles N1 jouent un rôle direct dans la régression tumorale, en utilisant des mécanismes de mort tels que ceux médiés par Fas/FasL ou dépendants des espèces réactives oxygénées aussi appelées ROS (*Reactive Oxygen Species*)[8]. Une augmentation de l'infiltrat des neutrophiles N1 et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN-γ ont été observées dans des modèles de

gliome. La déplétion de ces neutrophiles conduit à une croissance accrue de la tumeur dans ces modèles, impliquant un rôle important de ces cellules dans l'immunité anti-tumorale[9]. En revanche, les neutrophiles N2 ont des actions pro-tumorales. Ces cellules secrètent des molécules telles que l'oncostatine, l'élastase ou encore des facteurs comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), favorisant la croissance des cellules tumorales et l'angiogenèse tumorale. Les neutrophiles N2 peuvent également inhiber la réponse des LT anti-tumoraux *via* la production de molécules inhibitrices comme l'arginase[10].

2. Les éosinophiles

Les éosinophiles sont retrouvés dans de nombreux types de cancers. Ils peuvent avoir des actions anti-tumorales grâce à la production de composés cytotoxiques tels que la peroxydase ou la protéine cationique. Leur action anti-tumorale peut également être médiée par la libération de granules lytiques ou cytokiniques contenant du TNF-α (*Tumor Necrosis Factor α*)[11]. Dans certaines études, une croissance tumorale importante a été observée chez des souris déficientes en CCL11 (une cytokine produite par les éosinophiles), et chez des souris déficientes en éosinophiles, ce qui implique un rôle anti-tumoral important des éosinophiles[12,13]. En revanche, sous l'action du TGF-β et de l'IL-10, les éosinophiles peuvent libérer des granules contenant des cytokines pro-tumorales comme l'IL-4.

3. Les basophiles

Les basophiles représentent moins de 1% des leucocytes du sang périphérique. Ils sont retrouvés dans un certain nombre de tumeurs malignes, notamment les leucémies myéloïdes aiguës et chroniques[14,15]. Les basophiles produisent de l'IL-4 et différents médiateurs impliqués dans les réactions allergiques. Ils pourraient exercer une forte influence sur les réponses immunitaires induites dans les tumeurs par des mécanismes encore inconnus[16].

4. Les cellules *Natural Killer* (NK)

Les cellules NK sont de puissantes cellules cytotoxiques de l'immunité capables de répondre rapidement à une menace, et de détruire les cellules anormales à l'aide de molécules cytotoxiques telles que l'IFN-γ, la perforine et les granzymes. Elles expriment différents récepteurs activateurs et inhibiteurs leur permettant de reconnaître et d'éliminer efficacement les cellules tumorales ayant perdu l'expression de molécules du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH) de classe I. La capacité des cellules NK à lyser les cellules tumorales a été découverte en 1975[17,18]. Une forte densité de cellules NK dans le tissu tumoral est corrélée à un meilleur pronostic chez les patients. Ceci a d'abord été démontré dans le cancer colorectal par Coca et al.[19] en 1997 et plus tard dans de nombreux autres types de cancers tels que les carcinomes hépatocellulaires[20] et gastriques[21], les adénocarcinomes du poumon[22], les cancers du rein[23], les cancers à cellules squameuses de l'œsophage[24], les cancers du poumon[25] et les cancers de la vulve[26]. Toutefois, dans certaines conditions, dans le microenvironnement tumoral, sous l'action séparée ou combinée du TGF-β et de la prostaglandine E2, l'activité des cellules NK peut être inhibée, les rendant ainsi inefficaces face aux cellules tumorales[27,28].

5. Les lymphocytes T non conventionnels NKT

Les cellules NKT expriment certains marqueurs de surface également retrouvés sur les cellules NK et reconnaissent CD1d (*Cluster of Differentiation* 1d), une molécule du CMH non conventionnelle capable de présenter des antigènes lipidiques et glycolipidiques. Il existe deux sous-populations de NKT, les NKT de type I (NKT-I, aussi appelés *invariant NKT* ou iNKT) et les NKT de type II (NKT-II)[29]. Les NKT jouent un rôle indirect dans l'immunité anti-tumorale *via* la sécrétion de l'IFN-γ et de l'IL-4. Ils permettent la lyse efficace des cellules tumorales par des molécules effectrices telles que la perforine, le granzyme B et FasL[30]. Il a été observé que de faibles niveaux circulants de cellules NKT étaient associés à un mauvais pronostic chez des patients atteints de carcinome de la tête et du cou[31]. Il a récemment été démontré que les cellules NKT-I étaient capables d'avoir un effet cytotoxique *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancers colorectaux et *in vivo* dans des modèles murins[32]. Les lymphocytes NKT-I sont associés a des effets anti-tumoraux[33] alors que les NKT-II sont décrits comme délétères pour la réponse immunitaire anti-tumorale. Les lymphocytes NKT-II sont, par exemple, capables d'inhiber la fonction des NK et des LT cytotoxiques *via* la sécrétion de l'IL-4, de l'IL-13 et du TGF-β[34].

6. Les lymphocytes T non conventionnels γδ

Les lymphocytes Tγδ sont majoritairement présents dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, et partagent plusieurs caractéristiques des LT et des cellules NK. On les retrouve également au niveau de la langue, de l'œsophage, de la trachée, des poumons, des

épithéliums génitaux et dans la peau[35]. Il existe deux principales sous-populations de LTγδ : une que l'on retrouve dans le sang périphérique exprimant une chaîne δ du TCR (*T Cell Receptor*) avec une région variable Vδ2, et l'autre qui réside dans les tissus épithéliaux, exprimant une chaîne δ du TCR avec une région variable Vδ1. La première sous-population Vδ2 est capable d'éliminer efficacement des cellules de myélome et de lymphomes[36–38]. La seconde sous-population Vδ1 est retrouvée dans plusieurs types de cancers épithéliaux[39], notamment dans les cancers colorectaux, et sa présence est corrélée à un bon pronostic chez les patients[40]. Les LTγδ exercent leur action anti-tumorale en libérant un certain nombre de cytokines telles que le TNF-α et l'IFN-γ.

7. Les cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives ou MDSC représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures avec une puissante activité immunosuppressive. Les cellules myéloïdes suppressives humaines peuvent être induites par l'incubation de cellules mononucléées du sang périphérique avec du GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) avec de l'IL-6, du GM-CSF avec de l'IL-1β, de la prostaglandine E2, du TNF-α et du VEGF[41]. Dans les tumeurs, les MDSC peuvent inhiber la prolifération et l'activation des LT par l'intermédiaire de l'arginase, des ROS ou des espèces réactives de l'azote aussi appelées RNS (*Reactive Nitrogen Species*). De plus, elles peuvent inhiber les réponses immunitaires anti-tumorales par la suppression des LT et des NK[42] mais produisent également des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF-β. Enfin, les MDSC peuvent favoriser l'angiogenèse et l'apparition des métastases mais également l'activation des LT régulateurs via l'interaction CD40-CD40L[16].

8. Les macrophages

Le rôle des macrophages dans la croissance et le développement tumoral est complexe, car ils peuvent influencer la progression des tumeurs de diverses façons. Dans certains cas, les macrophages associés à la tumeur ont des rôles anti-tumoraux et dans d'autres ils favorisent la survie et la croissance tumorale. En réponse à des stimuli environnementaux, les macrophages peuvent se différencier en deux sous-types : les macrophages M1 pro-inflammatoires et les macrophages M2 anti-inflammatoires (Figure 2). L'IFN-γ seul, ou de façon conjointe avec du lipopolysaccharide (LPS) ou du TNF, induit la polarisation des macrophages en sous-type M1

(activation « classique »). La polarisation M2 (activation « alternative ») des macrophages est, quant à elle, favorisée par l'IL-4 et l'IL-13[43–45]. Les macrophages M1 sont des pro-Th1 capables d'effets anti-tumoraux. Ils ont la capacité de tuer des cellules cibles par des mécanismes dépendant des ROS, des RNS, de la production de l'IL-1β et du TNF-α (Figure 2). Les macrophages M1 favorisent également une cytotoxicité indirecte par l'activation d'autres cellules immunitaires, telles que les cellules NK et les LT[46]. En revanche, les macrophages M2 favorisent l'angiogenèse tumorale et le développement des métastases. Ils favorisent également l'immunosuppression par la production d'IL-10, ce qui facilite le développement de cellules Th2 produisant de l'IL-4 qui, grâce à un rétrocontrôle positif, permet la génération de nouveaux macrophages M2. Les macrophages M2 produisent également du CCL22 permettant le recrutement des LT régulateurs pour supprimer la fonction des LT cytotoxiques[16]. Dans de nombreuses tumeurs, le nombre élevé de macrophages M2 associés à la tumeur est corrélé avec un mauvais pronostic[47,48]. Dans les cancers colorectaux, il a été observé que la présence et les fonctions des macrophages M1 étaient plus importantes que celles des macrophages M2, ce qui conduit à une amélioration du pronostic [49–51].

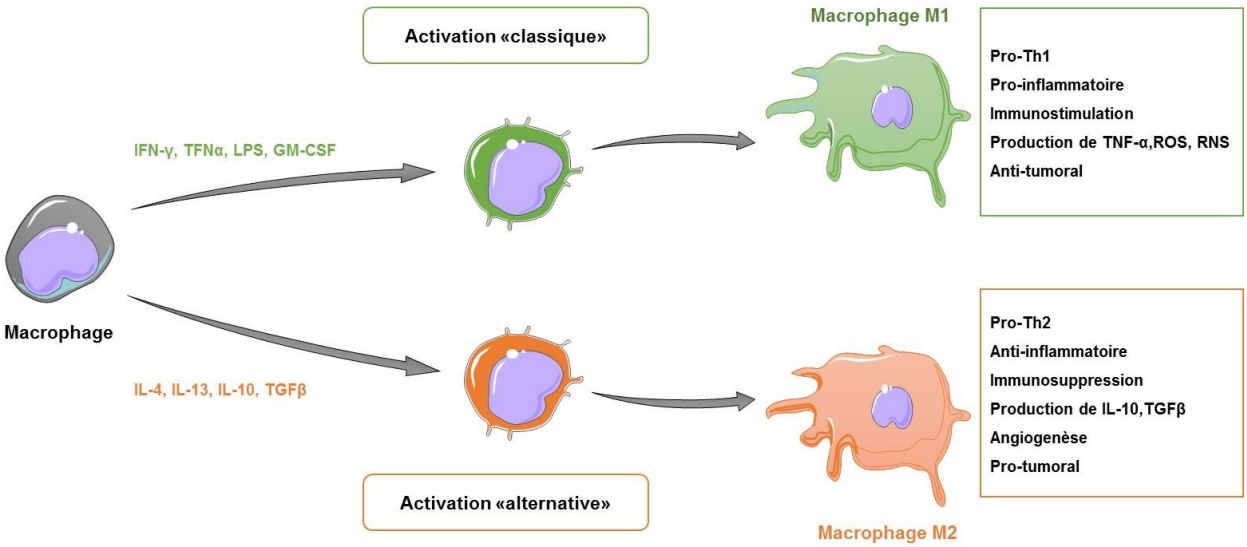


Figure 2 : Polarisation des macrophages (M1/M2)

Sous l'effet de certaines cytokines les macrophages se différencient en sous-type M1 ou M2. Les macrophages de phénotype M1 ont un rôle anti-tumoral, tandis que les macrophages M2 contribuent à la progression tumorale.

9. Les cellules dendritiques

Le terme « cellule dendritique » a été introduit en 1973 par l'immunologiste canadien Ralph Steinman pour décrire une petite population de cellules spléniques murines caractérisées par une morphologie très particulière en forme d'arbre (d'où la désignation dendritique d'après le terme grec "dendron", signifiant arbre)[52]. Cette découverte a fait l'objet du prix Nobel de physiologie et de médecine décerné en 2011 au regretté lauréat Ralph Steinman[53,54].

Les cellules dendritiques sont des cellules dérivées de la moelle osseuse et sont retrouvées dans la majorité des tissus. Elles s'accumulent dans les sites où les antigènes sont fortement présents, tels que les organes lymphoïdes, la peau ainsi que les muqueuses internes et externes. Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) « professionnelles » qui initient la réponse immune en présentant des antigènes capturés, à la fois sur des molécules du CMH de classe I (CMH-I) et des molécules du CMH de classe II (CMH-II), à des LT naïfs (LT qui n'ont jamais rencontré l'antigène) dans les tissus lymphoïdes (Figure 3)[55]. Les cellules dendritiques ont également un rôle important dans le contrôle de l'immunité humorale. Elles interagissent directement avec les cellules B, et indirectement en induisant l'expansion et la différenciation des LT $CD4^+$ auxiliaires[56]. Chez l'homme comme chez la souris, il existe deux grandes sous-populations de cellules dendritiques : les cellules dendritiques myéloïdes ou mDC (*myeloid Dendritic Cells*, également connues sous le nom de cDC pour *classical Dendritic Cells* ou *conventional Dendritic Cells*) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDC (*plasmacytoid Dendritic Cells*).

Dans des modèles murins de cancer, il a été démontré que les cellules dendritiques pouvaient capter des antigènes tumoraux libérés à partir de cellules tumorales, vivantes ou mortes, et les présenter *via* le mécanisme de la présentation croisée aux LT $CD8^+$ dans les ganglions lymphatiques[57,58]. Cela conduit à la génération de lymphocytes T cytotoxiques (LTC) spécifiques contribuant ainsi au rejet de la tumeur[59,60]. En effet, des quantités importantes de mDC infiltrant les tumeurs ont été associées à un pronostic favorable dans un large panel de tumeurs solides[61–65]. Toutefois, les cellules dendritiques peuvent avoir aussi des effets pro-tumoraux directs ou indirects. Par exemple, dans les myélomes multiples, les mDC favorisent directement la survie des cellules tumorales[66]. Dans les cancers de l'ovaire, les pDC contribuent à l'angiogenèse tumorale en sécrétant des cytokines pro-angiogéniques[67]. L'accumulation de cellules dendritiques tolérogènes, aussi bien des mDC $CD208^+$ et des pDC

CD123^{+}, au sein de certaines tumeurs telles que les cancers colorectaux, les mélanomes et les cancers du sein, a également été définie comme un mauvais facteur pronostique[68–71].

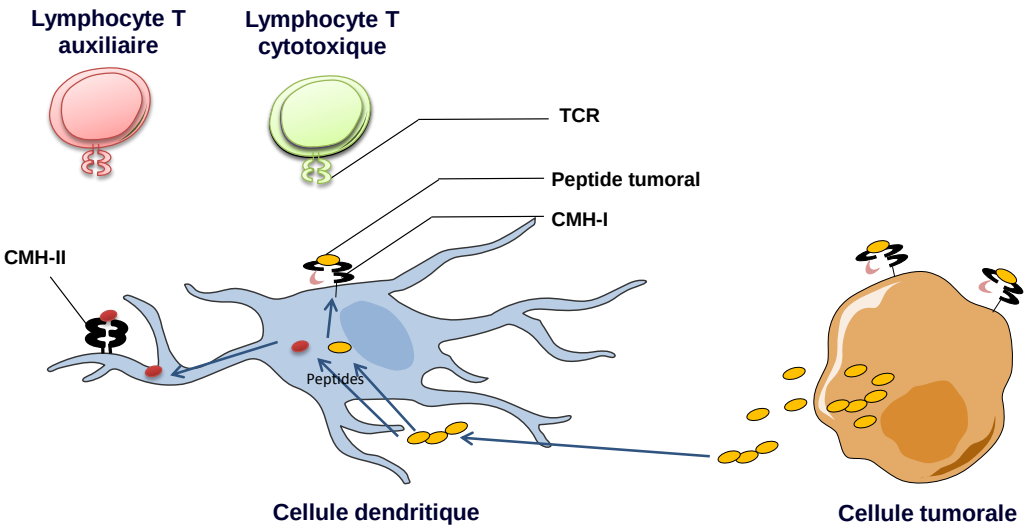


Figure 3 : La cellule dendritique

La cellule dendritique, qui est une CPA professionnelle, initie et module la réponse immune Les cellules dendritiques possèdent la capacité d' « apprêter » un peptide antigénique dérivé d'un antigène « exogène » et de le présenter non seulement au sein d'une molécule du CMH de classe II à un LT CD4+, mais également, par le mécanisme de présentation croisée, au sein d'une molécule du CMH de classe I à un LT CD8+. La présentation croisée est un mécanisme important permettant d'activer les LTC, pour la défense immunitaire contre les pathogènes intracellulaires et les tumeurs.

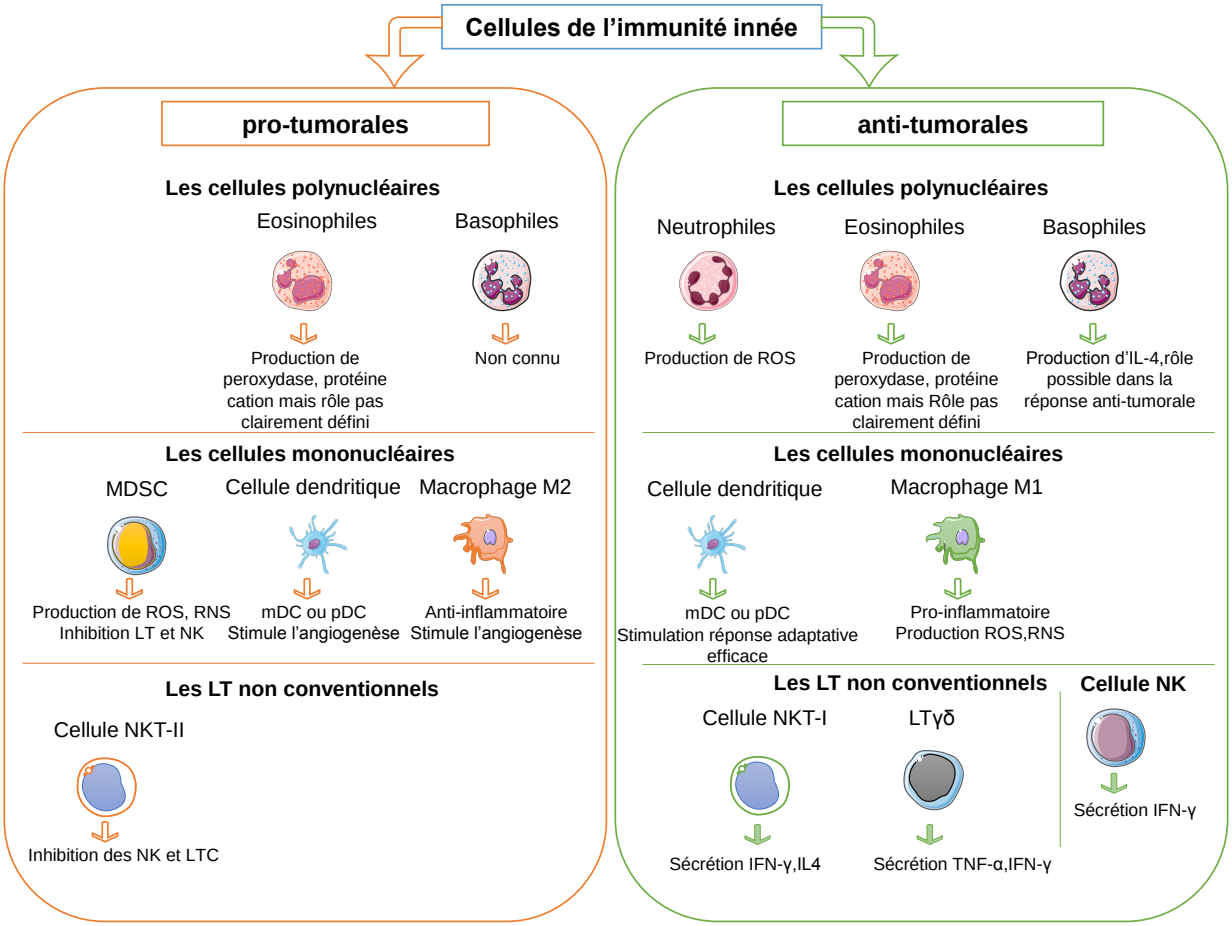


Figure 4 : Les différentes cellules de l'immunité innée et leur rôle pro ou anti-tumoral.

En résumé, les cellules du système immunitaire inné, infiltrant les tumeurs, jouent un rôle important dans la progression tumorale en l'inhibant ou en favorisant sa croissance (Figure 4). La compréhension des effets anti-tumoraux et pro-tumoraux de ces différents acteurs de l'immunité innée représentent donc un défi important pour le développement de nouvelles approches d'immunothérapie du cancer.

B. Les cellules de la réponse immunitaire adaptative associées aux tumeurs

Le système immunitaire adaptatif comprend les lymphocytes B et les lymphocytes T. Contrairement à la réponse immunitaire innée, qui est non spécifique, la réponse immunitaire adaptative se fait grâce à une vaste gamme de récepteurs d'antigènes, très divers et très spécifiques, présents sur les LB (exprimant un BCR : *B Cell Receptor*) et sur les LT (exprimant un TCR : *T Cell Receptor*). Une réponse immunitaire adaptative efficace est déclenchée lorsqu'un LB ou un LT reconnaît un antigène, et subit une activation spécifique

permettant sa prolifération. Ce processus prolifératif, connu sous le nom de sélection clonale, favorise des réponses immunitaires robustes et spécifiques ainsi que le développement de cellules mémoires de longue durée. La compréhension du rôle du système immunitaire adaptatif dans les tumeurs nécessite donc une connaissance précise des LB et des LT.

1. Les lymphocytes B

Les LB sont capables de reconnaître un antigène soluble *via* leur BCR. Une fois que le BCR se lie spécifiquement à l'antigène soluble, la cellule va pouvoir se diviser, croître, et se différencier en plasmocytes. Les plasmocytes prolifèrent et sécrètent de grandes quantités d'anticorps hautement spécifiques. Pour lyser les cellules tumorales, les anticorps spécifiques des tumeurs ont plusieurs mécanismes effecteurs tels que l'activation de la cascade du complément et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*). Le rôle des LB dans la réponse immunitaire anti-tumorale est controversé[72]. Il existe trois sous-populations de LB : les Be1 (*B effectors 1*), les Be2 (*B effectors 2*) et les B régulateurs (Breg). Les Be1 peuvent favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale contrairement aux Be2 qui participent plutôt à l'échappement tumoral[73]. Les Breg sécrètent de l'IL-10 et du TGF-β, et peuvent alors modifier l'équilibre des réponses immunitaires spécifiques de la tumeur en faveur de l'immunosuppression, permettant ainsi la progression de la tumeur[16,74].

2. Les lymphocytes Tαβ

Les LT classiques αβ reconnaissent de petits peptides présentés par des molécules du CMH à la surface des CPA. Il existe deux grandes classes de LT : les LT $CD4^+$ et les LT $CD8^+$. Les LT $CD4^+$ reconnaissent les antigènes présentés par les molécules du CMH-II, exprimées par les CPA. Les LT $CD8^+$ reconnaissent les antigènes présentés par les molécules du CMH-I, présentes sur toutes les cellules nucléées disomiques de l'organisme.

a. Les lymphocytes T CD4+

Après l'activation par une CPA, un LT $CD4^+$ naïf peut se différencier en de nombreuses sous-populations de LT $CD4^+$ effecteurs en fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement lors de l'activation. Après différenciation, on peut obtenir des LT $CD4^+$ auxiliaires qui aident les LB, les cellules NK et les LT $CD8^+$ cytotoxiques à s'activer *via* la libération de certaines cytokines. Différents types de LT $CD4^+$ auxiliaires existent et ils ont

des rôles distincts en fonction de leur cible et du type de réponse immunitaire généré (Th1, Th2, Th17, Tfh, etc.). Les cellules Th1 produisent de l'IFN-γ et plusieurs autres cytokines qui favorisent principalement les réponses immunitaires à médiation cellulaire. Les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, et contribuent principalement à la réponse immunitaire humorale[16,75]. De nombreuses études suggèrent que les cellules Th1 pourraient inhiber la croissance tumorale contrairement aux Th2. L'activation des cellules Th1 favorise la génération des LTC, ainsi que l'activation des cellules NK et d'autres cellules effectrices ayant un potentiel cytotoxique. Un déséquilibre Th1/Th2 est souvent mis en place au cours du développement d'une tumeur. Ce déséquilibre étant souvent en faveur des Th2, on assiste donc à de fortes productions de cytokines Th2 favorisant plutôt des réponses anti-inflammatoires[76]. Ce déséquilibre pourrait réduire les réponses immunitaires anti-tumorales médiées par les Th1. De plus, la prévalence des réponses Th2 dans la tumeur peut faciliter la génération de MDSC, favorisant ainsi la croissance tumorale.

Les cellules Th17 sont une sous-population sécrétrice d'IL-17, IL-22 et IL-23. Leur rôle dans la réponse immunitaire contre des agents pathogènes est clairement établi. Par contre, leur rôle dans l'immunité contre le cancer est très controversé. Des études rapportent à la fois des activités anti-tumorales et pro-tumorales[77]. Dans certaines tumeurs, comme les mélanomes, l'infiltrat Th17 est associé à un pronostic favorable. En revanche, dans d'autres types de tumeurs comme les cancers colorectaux, cet infiltrat est associé à un mauvais pronostic[78].

Les LT ayant un phénotype Tfh (*follicular helper T cell*) sécrètent de l'IL-4, du TNF, de l'IFN-γ, et de la lymphotoxine α. L'infiltrat des cellules Tfh peut influencer la croissance tumorale et la survie dans certaines tumeurs lymphoïdes[79]. Leur nombre semble être un facteur pronostique important dans ces tumeurs lymphoïdes[80]. Une augmentation de l'infiltrat Tfh a, par exemple, été observée chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, en particulier dans les stades avancés. Dans ces leucémies, les Tfh sécrètent de l'IL-21 et induisent la prolifération des cellules leucémiques[81,82]. Contrairement à leurs effets pro-tumoraux possibles dans les tumeurs lymphoïdes, les cellules Tfh peuvent avoir un rôle protecteur dans les tumeurs non lymphoïdes. Ils peuvent être abondants dans les infiltrats inflammatoires observés dans les cancers du sein, et leur présence dans ces tumeurs a été associée à l'amélioration de la survie et à une baisse de l'immunosuppression[83]. Un infiltrat de cellules Tfh a également été observé dans les cancers colorectaux, positivement corrélé à une amélioration de la survie[84].

Lorsque les LT $CD4^+$ reconnaissent un antigène dans un contexte immunosuppresseur (TGF-β ou IL-10), ils se différencient en cellules T régulatrices, qui sont d'importants régulateurs négatifs du système immunitaire et peuvent constituer une cible importante pour l'immunothérapie.

b. Les lymphocytes T régulateurs CD4+

Il existe 2 deux grandes populations de LT régulateurs (LTreg) : la première se développe naturellement dans le thymus, et la seconde est induite en périphérie par le TGF-β[85]. Dans les conditions physiologiques normales, les LTreg bloquent les réactions auto-immunes et la destruction des tissus en limitant les réponses immunitaires en cours, puis maintiennent la tolérance aux antigènes du soi[86,87]. Cette population de LT est caractérisée par la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10 ou TGF-β) et l'expression de molécules telles que CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) qui inhibent l'activation et la prolifération des cellules effectrices $CD4^+$ et $CD8^+$[88]. Le nombre de LTreg circulant augmente chez certains patients atteints de cancer par rapport aux donneurs sains[89–91]. Un grand nombre de LTreg infiltrants a également été observé dans le microenvironnement tumoral chez certains patients atteints de divers cancers. Ainsi, une forte densité de cellules T régulatrices a été fréquemment retrouvée dans les ganglions lymphatiques et dans le sang de patients atteints de cancer colorectal comparé aux individus sains[92–94]. Différentes études ont associé la présence des LTreg dans les tumeurs à un bon ou à un mauvais pronostic. Par exemple, dans une étude réalisée chez 104 patientes atteintes de cancer de l'ovaire, les LTreg supprimaient les cellules T spécifiques de la tumeur et contribuaient à la croissance tumorale[95]. Dans les cancers colorectaux, certaines études ont établi une corrélation entre la forte densité de LTreg $FoxP3^+$ infiltrant les tumeurs et un mauvais pronostic[96,97]. D'autres études ont cependant découvert que cet infiltrat pourrait être associé à un bon pronostic[98–100]. Dans notre équipe, une étude réalisée sur les cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire a mis en évidence qu'une forte densité de lymphocytes $FoxP3^+$ infiltrant la tumeur était clairement associée à des caractéristiques tumorales moins invasives, et donc pourrait être associée à un meilleur pronostic[101].

c. Les lymphocytes T CD8+

Plusieurs études mettent en évidence le rôle clé des LT $CD8^+$ dans l'immunité anti-tumorale. Les premières études réalisées dans des modèles précliniques de cancer ont montré que ces cellules empêchaient la croissance tumorale. Uyttenhove et ses collaborateurs ont montré que l'échappement des mastocytomes P815 au système immunitaire était dû à l'absence de certaines spécificités des LT $CD8^+$[102]. Des travaux ultérieurs ont montré que durant la phase d'équilibre (phase au cours de laquelle les cellules cancéreuses persistent mais sont maintenues sous contrôle du système immunitaire), la déplétion des LT $CD8^+$ stimulait la croissance des cellules cancéreuses. Ceci souligne l'importance des LT $CD8^+$ dans le contrôle de la croissance tumorale[103].

Dans la grande majorité des cancers humains, les LT $CD8^+$ infiltrant les tumeurs sont associés à un meilleur pronostic chez les patients. Dans le cancer du côlon, les tumeurs non métastatiques présentent un nombre important de cellules effectrices mémoires T $CD8^+$, et la présence de ces cellules dans le microenvironnement de la tumeur est corrélée avec un meilleur pronostic[104]. Ces résultats ont été confirmés avec d'autres cohortes de patients et un consortium international évalue actuellement l'utilisation en routine des données de l'infiltrat immunitaire pour prédire la survie des patients[105,106]. Le pronostic favorable des infiltrats de LT $CD8^+$ a également été documenté dans d'autres types de cancer, comme le cancer du sein et le cancer de l'ovaire[107,108]. Toutefois, des études montrent également que les LT $CD8^+$ intra-tumoraux perdent souvent leurs fonctions effectrices, ce qui peut favoriser la progression tumorale.

d. Les lymphocytes T CD8+ effecteurs

En présence de différents facteurs produits par les LT $CD4^+$, les LT naïfs $CD8^+$ se différencient en cellules T effectrices qui expriment des niveaux importants de perforine et de granzymes[109–111]. L'action coordonnée de ces molécules cytotoxiques des LT $CD8^+$ activés permet l'activation des caspases dans les cellules cancéreuses et conduit à la mort cellulaire (Figure 5)[110,112,113]. Compte tenu du potentiel des LT $CD8^+$ à détruire les cellules cancéreuses, ces cellules sont souvent appelées des lymphocytes T cytotoxiques (LTC). Les LTC peuvent également éliminer les tumeurs *via* la voie de Fas/Fas ligand. Toutefois, les cellules tumorales peuvent perdre l'expression de Fas ou acquérir des mutations dans la voie de l'apoptose mettant en jeu FasL, développant ainsi une résistance à la cytotoxicité des LTC médiée par Fas/FasL. Il existe d'autres mécanismes par lesquels les tumeurs peuvent résister aux LTC

tels que l'augmentation de l'expression des molécules anti-apoptotiques ou des changements dans les composants du cytosquelette qui empêchent la formation d'une surface de contact stable entre les LTC et les cellules tumorales[109].

Les LT CD8$^+$ peuvent également reconnaître des antigènes tumoraux du stroma. La cytotoxicité contre le stroma tumoral peut donc aussi être un mécanisme majeur de la régression de la tumeur. Les LT CD8$^+$ activés sécrètent également des cytokines comme le TNF-α et l'IFN-γ, qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle des réponses immunitaires anti-tumorales et dans le contrôle de la croissance tumorale. La sécrétion d'IFN-γ par les LTC peut améliorer la présentation de l'antigène, les fonctions anti-tumorales des macrophages, et limiter l'angiogenèse tumorale[114,115].

En résumé, le rôle anti-tumoral des cellules T effectrices CD8$^+$ dans le tissu tumoral peut donc être attribué à la fois à leur activité cytotoxique directe et à leur sécrétion de cytokines. Les cellules T CD8 multifonctionnelles qui présentent une activité cytotoxique ainsi qu'une production de TNF-α et d'IFN-γ peuvent donc être les effecteurs anti-tumoraux les plus robustes. En revanche, il faut noter que l'efficacité de ces cellules T effectrices CD8$^+$ dans le microenvironnement tumoral peut être limitée car elles subissent une différenciation terminale et perdent leur capacité d'auto-renouvellement.

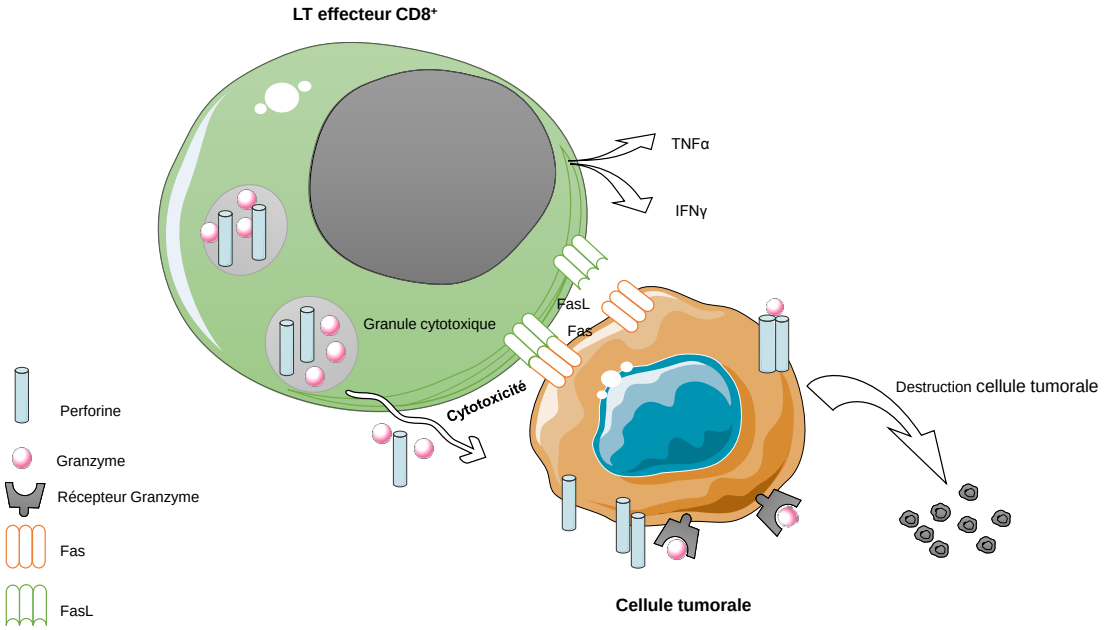


Figure 5 : Mécanismes principaux de destruction des cellules tumorales par les LT effecteurs CD8$^+$

Les LT effecteurs CD8$^+$ éliminent les cellules tumorales par les biais des mécanismes cytotoxiques tels que l'interaction Fas/FasL et la libération des granules lytiques chargés en perforine et granzymes.

e. Les lymphocytes T souches mémoires CD8+

Les cellules T $CD8^+$ souches mémoires partagent des propriétés avec des cellules T $CD8^+$ naïves telles que l'expression de CCR7 et de CD62L, et ont la capacité d'auto-renouvellement. En raison de leur capacité d'auto-renouvellement et de leur longue survie, elles ont été appelées cellules T souches mémoires $CD8^+$ ou T_{SCM} (*stem cell-like memory T cells)*. Les cellules T souches mémoires $CD8^+$ se retrouvent principalement dans les tissus lymphoïdes. L'identification récente de l'IL-7 et de l'IL-15 comme signaux moléculaires permettant la différenciation de LT naïfs humains en cellules souches mémoires *in vitro* renforce l'intérêt d'étudier leur potentiel pour le développement de réponses cellulaires T efficaces et durables dans les cancers[116,117].

f. Les lymphocytes T CD8+ comme cellules régulatrices dans le cancer ?

Plusieurs types de LT $CD8^+$ ayant des propriétés régulatrices ou suppressives dans le cancer ont été décrits. On peut citer, par exemple, les cellules $CD8^+$ $CD28^-$, $CD8^+$ $CD25^+$, $CD8^+$ $CD122^+$ et $CD8^+$ $IL10^+$[118,119]. Actuellement, il semble n'y avoir aucun consensus pour savoir si celles-ci sont des sous-populations bien distinctes des autres types de cellules qui expriment certains des mêmes marqueurs de surface.

En conclusion, pour monter une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, une action coordonnée des cellules immunitaires innées et adaptatives (Figure 6) est nécessaire. Tous ces différents acteurs du système immunitaire recrutés au sein de la tumeur ont un rôle crucial, notamment les cellules effectrices telles que les LTC, mais également d'autres cellules effectrices comme les NK, les macrophages et les cellules NKT capables de détruire les cellules tumorales échappant à la reconnaissance par les LT. Toutefois, pour une intervention efficace des LT dans la surveillance de la tumeur, une activation adéquate de ces LT est nécessaire.

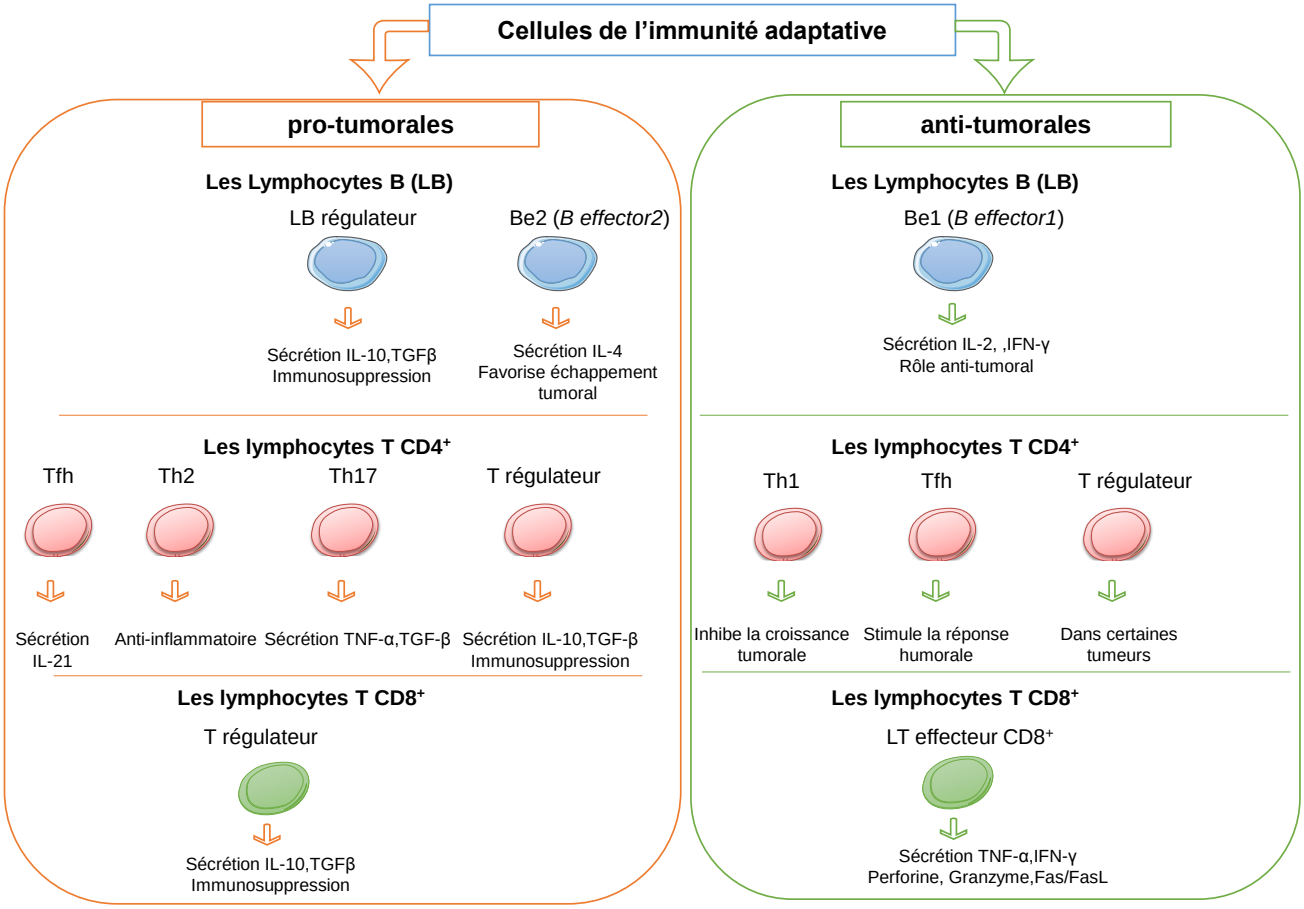


Figure 6 : Les différentes cellules de l'immunité adaptative et leur rôle pro ou anti-tumoral

III. Présentation des antigènes et activation des lymphocytes T

La reconnaissance de peptides liés aux molécules du CMH par les récepteurs des LT (TCR) est au cœur de l'activation de ces LT. L'activation et la prolifération des LT nécessitent une présentation efficace de l'antigène par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) au sein d'une véritable synapse immunologique (Figure 7)[120]. La synapse immunologique est une structure subcellulaire hautement organisée qui fournit une plate-forme pour la présentation de l'antigène par les principales molécules du CMH (CMH-I et II) à la surface des CPA.

Lors de l'activation des LT, les TCR reconnaissent des fragments d'antigènes liés aux molécules du CMH présentes à la surface des CPA. L'interaction CMH-peptide/TCR délivre un premier signal spécifique mais insuffisant pour déclencher l'activation complète du LT. Un deuxième signal est apporté par les molécules de co-stimulation. Enfin, un troisième signal apporté par la sécrétion de facteurs solubles, principalement cytokines et chimiokines, dans le

milieu permet la multiplication, la survie et la différenciation des LT. Une fois activés contre des antigènes tumoraux, les LT effecteurs peuvent migrer vers le tissu malin où ils développeront une réponse immunitaire anti-tumorale. Par exemple, les LTC activés lysent directement les cellules qui expriment à leur surface le complexe CMH-peptide dont ils sont spécifiques. Une réponse immunitaire anti-tumorale efficace passe par la présentation optimale de l'antigène sur les molécules du CMH par les CPA.

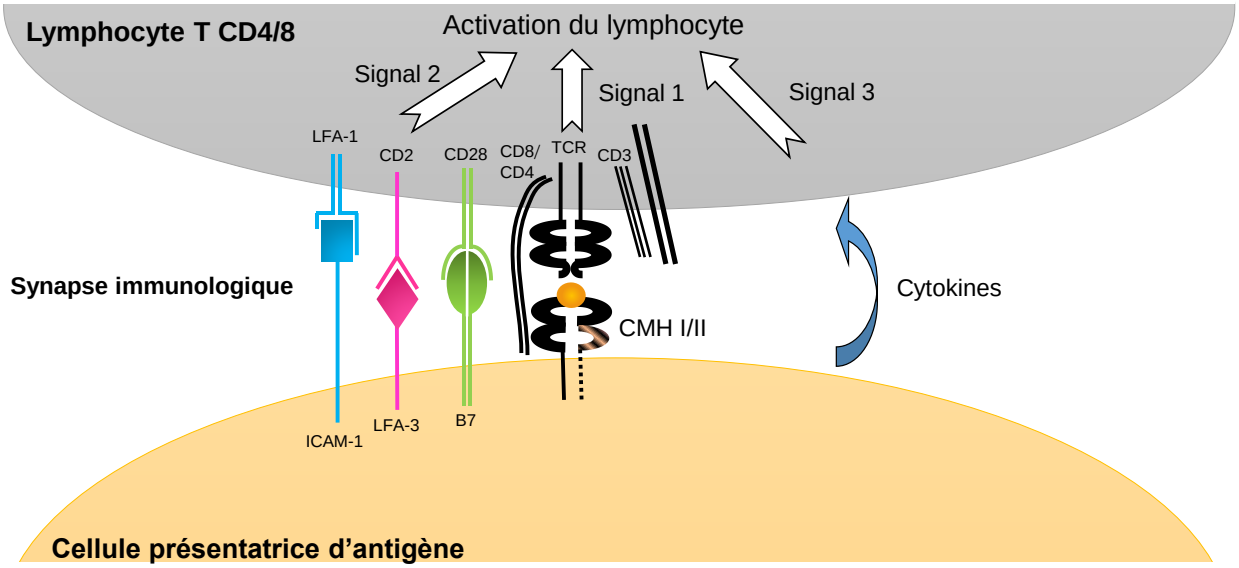


Figure 7 : Présentation de l'antigène tumoral dans la synapse immunologique

L'interaction entre les lymphocytes T CD8 ou CD4 et les cellules présentatrices d'antigène (plus particulièrement les cellules dendritiques) se fait au sein d'une véritable synapse immunologique. Au niveau de cette synapse, le complexe d'histocompatibilité de classe I, constitué d'une chaîne lourde et de la bêta-2 microglobuline, ou de classe II présente le peptide antigénique qui va interagir avec le récepteur spécifique du lymphocyte T ou TCR pour fournir un premier signal. Ce premier signal n'est pas suffisant pour l'activation complète des lymphocytes T. Afin d'être complètement activés, un second signal est fourni par des molécules accessoires comme la molécule de costimulation B7.1 sur les CPA qui reconnaît CD28 sur les LT et des molécules d'adhésion comme LFA-3 et ICAM-1 sur les CPA qui reconnaissent respectivement CD2 et LFA-1 sur les LT. Un troisième signal fourni par des facteurs solubles (cytokines et chimiokines principalement) est également important dans le devenir des cellules activées.

A. Interaction CMH-peptide/TCR (signal 1)

1. Présentation des antigènes sur les molécules de CMH

Les molécules du CMH-I et du CMH-II sont des glycoprotéines transmembranaires se liant à de courts peptides produits par les cellules qui expriment ces molécules. Les

mécanismes de présentation de l'antigène par le CMH-I et le CMH-II sont différents. Les peptides se liant aux molécules du CMH proviennent de différentes sources, intracellulaire pour les molécules du CMH-I et exogène pour les molécules du CMH-II, et sont obtenus par différentes voies[121]. Toutefois, un lien intéressant existe entre les deux voies de présentation (CMH-II et CMH-I), appelé la présentation croisée. En effet, grâce à ce mécanisme, des antigènes exogènes peuvent être présentés par les molécules du CMH-I[122], et des protéines cytosoliques (endogènes) peuvent être présentées par des molécules du CMH-II lorsque ces protéines sont dégradées par autophagie ou d'autres mécanismes[123].

2. Les molécules du CMH de classe I

Environ 500 000 molécules du CMH-I (HLA-I (*Human Leucocyte Antigen*) chez l'homme) sont exprimées sur presque toutes les cellules nucléées chez les mammifères[124,125]. Leurs niveaux d'expression peuvent varier considérablement en fonction de la distribution tissulaire et de l'état de la cellule. Les molécules du CMH-I sont constituées d'une chaîne lourde α polymorphe (43 kDa) ancrée dans la membrane et liée de manière non covalente mais avec une forte affinité à une chaîne légère invariante β appelée la β2-microglobuline (12,5 kDa). La chaîne lourde comporte 3 domaines α1, α2 et α3. Les domaines α1 et α2 ont une structure très similaire composée chacun de 4 feuillets β anti-parallèles. Ces deux domaines interagissent de telle sorte que les 8 plis β forment un plateau surmonté par deux hélices α délimitant une poche de 25 Å de long et 10 Å de large au niveau de laquelle se fixent les peptides qui seront présentés au système immunitaire (Figure 8)[126]. Chez l'homme, il existe trois familles principales de gène, HLA-A, HLA-B et HLA-C qui sont très polymorphiques. La chaîne lourde HLA A*0201 est la chaîne HLA-A la plus fréquente chez les caucasiens (40%)[126].

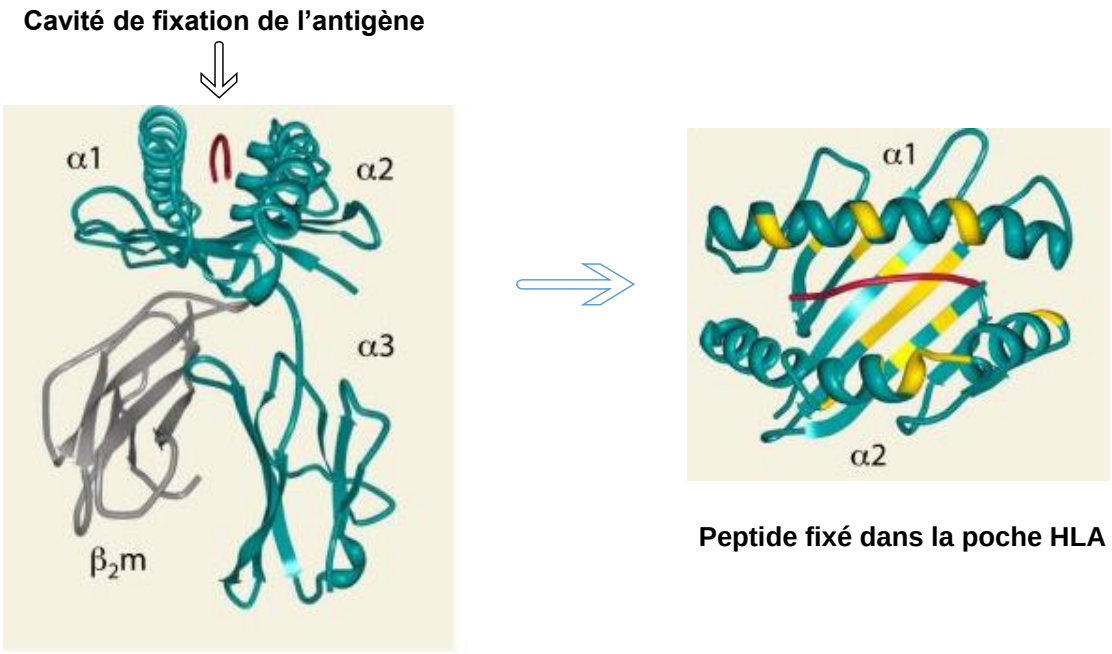


Figure 8 : Structure tridimensionnelle d'une molécule HLA-I

Les molécules du CMH de classe I humaines, aussi appelées HLA de classe I, sont des glycoprotéines qui sont composées d'une chaîne lourde α (en bleu) liée de façon non covalente à une chaîne légère appelée la β2-microglobuline (en gris). La chaîne α comporte 3 domaines α1, α2 et α3. Les domaines α1 et α2 interagissent pour former un plateau surmonté par deux hélices α délimitant une poche au niveau de laquelle se fixent les peptides (en rouge) qui seront présentés au système immunitaire. D'après Blum et al, Annu Rev Immunol 31: 443–473 (2013)

a. Les ligands du CMH de classe I

La majorité des peptides associés aux molécules du CMH-I proviennent de protéines dégradées par des protéases cytosoliques et sont transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) par la machinerie TAP (*Transporter associated with Antigen Presentation*). Ces peptides sont généralement composés de 8 à 12 acides aminés, et se lient à la poche à la fois par leurs extrémités N-terminale et C-terminale. Dans la plupart des cas, ces peptides ont une longueur déterminée par la chaîne lourde à laquelle ils se lient, comme par exemple des nonamères pour HLA-A2, chez l'homme[127]. Il a été estimé que les diverses molécules de CMH-I peuvent présenter chacune plus de 10.000 peptides différents, qui partagent un motif conservé représentant un « résidu d'ancrage » responsable de la liaison spécifique au CMH[128]. Les « résidus d'ancrage » varient d'un allèle du CMH à un autre, et permettent la stabilité du peptide dans la poche. Le groupe de Hans-Georg Rammensee (Tübingen, Allemagne), après séquençage par spectrométrie de masse des peptides élués à partir des poches des molécules

HLA-A2.1 de cellules tumorales P815, a trouvé que l'acide aminé Leucine (Leu), situé en position P2 de chaque peptide séquencé, et l'acide aminé Valine (Val), situé en position C-terminale des peptides séquencés, représentaient de forts motifs d'ancrage à la poche de HLA-A2[127]. L'équipe de Victor H. Engelhard (Virginie, USA) a confirmé ces données par spectrométrie de masse en montrant que la Leucine (ou Isoleucine qui se confond avec Leucine en masse) se situe bien en position P2 de chaque peptide séquencé. En revanche, en position C-terminale, il a été retrouvé que la Leucine et l'Alanine en plus de la Valine, précédemment identifiée, étaient des résidus d'ancrage dominants[129].

En plus des « résidus d'ancrage », une série de liaisons hydrogène relient certains résidus du CMH-I avec les atomes de la chaîne principale des peptides[130]. La répartition de ces liaisons hydrogène constitue une différence fondamentale entre les molécules du CMH-I et celles du CMH-II. Dans les molécules de classe I, ces liaisons hydrogène sont situées aux extrémités du site de liaison, et leurs interactions avec les extrémités N- et C-terminales du peptide, limitent la longueur des peptides qui peuvent se lier de manière stable aux molécules du CMH-I. L'interaction de la poche avec les « résidus d'ancrage » optimaux, et la présence des liaisons hydrogène, sont nécessaires pour former des complexes CMH-I-peptide stables[130]. Un critère important dictant donc la nature des peptides pouvant se lier aux poches des molécules du CMH de classe I est la composition en acides aminés du peptide et de la poche. Chacune des formes alléliques du CMH-I se lie donc à un mélange complexe de peptides structurellement distincts.

b. Rôle important du protéasome dans la génération des ligands du CMH-I

Les peptides présentés par les molécules du CMH-I sont dérivés de protéines endogènes ou de protéines captées dans le milieu extracellulaire lors de la présentation croisée[131]. Dans les deux cas, le protéasome constitutif 26S est le complexe enzymatique qui détermine les « résidus d'ancrage » carboxy-terminaux des peptides qui se lient au CMH-I[132]. Il permet la dégradation des protéines en fragments peptidiques d'une taille appropriée pour le transport par la machinerie TAP dans le RE[133–135]. Le protéasome 26S est un complexe multienzymatique constitué d'une sous-unité régulatrice 19S et d'une sous-unité protéolytique 20S. La sous-unité protéolytique 20S comprend quatre anneaux hétéro-heptamériques (deux anneaux de 7 sous-unités α et deux de 7 sous-unités β)[136]. L'activité protéolytique est portée par trois des sous-unités β (β1, β2 et β5), chacune possédant une spécificité de clivage unique

(Figure 9). La sous-unité β1 clive la protéine après les résidus acides (activité « caspase-like »), la β2 après les résidus basiques (activité « trypsine-like »), et la β5 après les résidus hydrophobes (activité « chymotrypsine-like »)[137]. Les molécules HLA-I se lient à des peptides ayant des résidus hydrophobes en C-terminal (produits du clivage de la sous-unité β5) et parfois à des peptides ayant des résidus basiques en C-terminal (produits du clivage de la sous-unité β2). Par contre, les molécules du CMH-I de souris se lient uniquement à des peptides avec des résidus hydrophobes en C-terminal[138]. Les peptides avec des résidus acides en C-terminal (produits du clivage de la sous-unité β1) ne peuvent normalement pas se lier au HLA-I ou au CMH-I murin[138].

Au début des années 1990, deux sous-unités β supplémentaires du protéasome, la sous-unité β1i (également connue sous le nom PSMB9 ou LMP2) et la sous-unité β5i (également connue sous le nom PSMB8 ou LMP7) ont été identifiées[139–142]. Un peu plus tard, une autre sous-unité, β2i (également connue sous le nom PSMB10, LMP10 ou MECL1), ayant une homologie avec la sous-unité β2 du protéasome constitutif, a été identifiée[137,143,144]. Après stimulation avec de l'IFN-γ et/ou du TNF, l'expression de ces trois sous-unités immuno-inductibles est fortement augmentée et conduit à la formation de l'immunoprotéasome [145,146] (Figure 9). Les ligands du CMH-I générés par l'immunoproteasome sont distincts et plus efficaces lors de l'activation des LTC que les ligands générés par le protéasome constitutif[145,147]. Ceci est dû, en partie, au remplacement de la sous-unité β1 par la sous-unité β1i. Ce remplacement conduit à l'élimination de l'activité « caspase-like » de la sous-unité β1 et l'amélioration de l'activité « chymotrypsine-like » grâce à la sous-unité β1i, et donc à la génération de peptides avec des résidus hydrophobes en C-terminal[137,148,149]. Par conséquent, des conditions pro-inflammatoires conduisent à la production de précurseurs de peptides avec des résidus C-terminaux encore plus adaptés.

Les produits du protéasome ont principalement une taille comprise entre 2 et 25 acides aminés[150,151], et la majorité ne disposent donc pas de la bonne longueur pour se lier au CMH-I. Les peptides les plus longs peuvent être digérés à leur extrémité N-terminale par diverses protéases cytosoliques, comme LAP[152], PSA, BLMH[153] ou TPPII[154], avant d'être transportés vers le RE par la machinerie TAP.

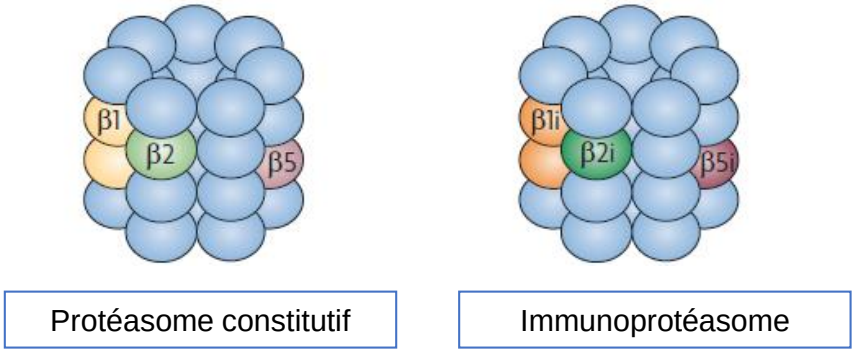


Figure 9 : Sous unités du protéasome constitutif et de l'immunoprotéasome

L'activité protéolytique du protéasome constitutif est portée par les sous-unités β1, β2 et β5. L'activité protéolytique de l'immunoprotéasome, induit par l'IFN-γ et/ou le TNF, est portée en partie par les sous-unités β1i, β2i et β5i. D'après Groettrup et al, Nat Rev Immunol. (2010)

c. Rôle de la machinerie TAP et du PLC (*Peptide Loading Complex*)

TAP est un hétérodimère composé de TAP1 et TAP2, qui permet la translocation active des peptides dans le RE. Il transporte préférentiellement des peptides de longueur comprise entre 8 et 13 acides aminés. Toutefois, les peptides ayant jusqu'à 40 résidus peuvent être transportés avec une faible efficacité[155,156]. TAP transporte préférentiellement les peptides ayant des résidus hydrophobes ou basiques en position C-terminale. Il transporte également des résidus hydrophobes en positions 2 et 3, tandis que la présence de résidus Proline ou acides dans les trois premières positions ne favorise pas le transport[157].

Une fois dans le RE, la formation des complexes CMH-I-peptide se produit dans le complexe de chargement du peptide ou PLC (*Peptide Loading Complex*). La tapasine et plusieurs autres protéines chaperonnes résidant dans le RE sont cruciales au cours de ce processus. La tapasine se lie à la machinerie TAP, puis à un résidu Cystéine dans le site actif de l'oxydoréductase ERp57[158,159]. L' hétérodimère ainsi formé recrute ensuite les molécules du CMH-I et la calréticuline dans le PLC[160]. La calréticuline permet le chargement des peptides transportés par TAP sur les molécules du CMH-I. La coupure finale des peptides est réalisée dans le RE par une aminopeptidase (ERAP1)[161]. Lorsque les peptides se lient aux molécules du CMH-I, les chaperonnes sont libérées et le complexe CMH-I-peptide ainsi assemblé quitte le RE pour être présenté à la surface de la cellule à un LT $CD8^+$ (Figure 10). Inversement, les peptides qui ne s'associent pas aux molécules du CMH-I dans le RE sont renvoyés vers le cytosol et dégradés[162].

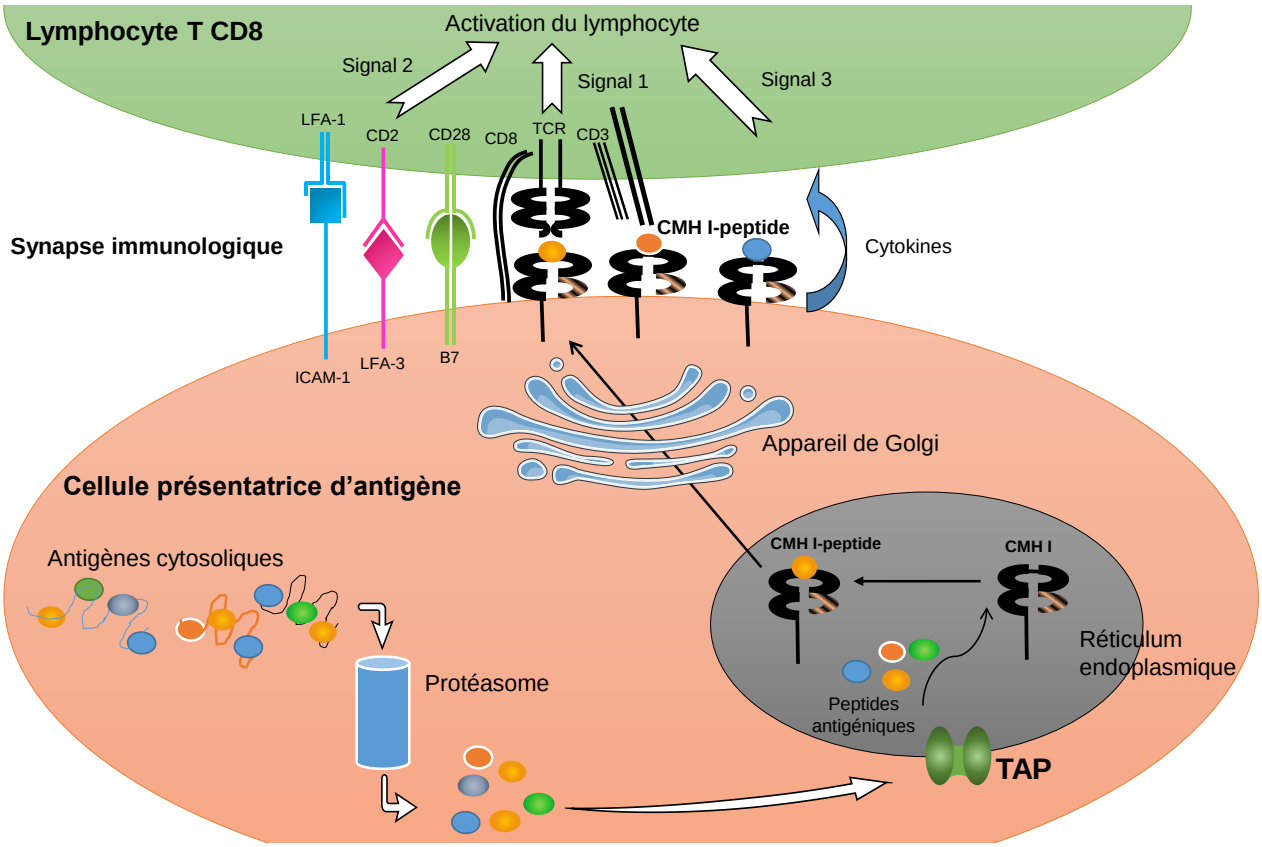


Figure 10 : Présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I

La présentation des peptides tumoraux par une molécule du CMH de classe I se fait suite à une série de réactions. Tout d'abord, les antigènes sont dégradés par le protéasome. Il en résulte des peptides tumoraux transportés via la machinerie TAP (*Transporter associated with Antigen Presentation*) dans le réticulum endoplasmique et chargés sur les molécules du CMH de classe I. Le complexe CMH de classe I-peptide est libéré du réticulum endoplasmique et transporté à la membrane plasmique *via* l'appareil de Golgi pour être présenté aux lymphocytes $CD8^+$.

3. Les molécules du CMH de classe II

Les molécules du CMH-II sont des glycoprotéines membranaires constituées de deux chaines α (33 kDa) et β (29 kDa) liées de façon non covalente. Les régions amino-terminales α1 et β1 forment le site de liaison des peptides (Figure 11). Les molécules du CMH-II sont exprimées de manière constitutive à la surface des CPA professionnelles, notamment les cellules dendritiques, les LB, les macrophages et les cellules épithéliales thymiques. Les mécanismes d'absorption de l'antigène, la nature des compartiments d'apprêtement de l'antigène et la durée de vie à la surface cellulaire des complexes CMH-II-peptide peuvent varier en fonction du type de CPA.

Les peptides antigéniques se liant à la molécule du CMH-II sont générés par la protéolyse de protéines du soi et du non-soi, dans les compartiments tels que les endosomes et les lysosomes, et présentés aux LT $CD4^+$ spécifiques[163]. Les antigènes accèdent à ces compartiments par divers mécanismes, tels que l'endocytose, la macropinocytose, la phagocytose et l'autophagie. Les molécules du CMH-II doivent également accéder à ces compartiments pour la liaison efficace du peptide. Les molécules du CMH-II nouvellement synthétisées, se lient à une protéine non polymorphe appelée la chaîne invariante Ii. La chaîne invariante Ii contient des motifs particuliers qui permettent de diriger le complexe CMH-II/Ii vers les compartiments d'apprêtement de l'antigène (endosomes/lysosomes)[163]. Les endosomes et les lysosomes sont riches en enzymes protéolytiques et ont un pH suffisamment bas pour activer les protéases pour la protéolyse de l'antigène[163]. Les peptides antigéniques résultant de la protéolyse vont pouvoir se lier aux molécules du CMH-II, seulement si la chaîne invariante Ii est dégradée et que le complexe CMH-II /Ii se dissocie[164].

Dans les LB, les cellules dendritiques, et les macrophages, la chaîne invariante Ii est dégradée dans des compartiments multivésiculaires ou MVBs (*Multivesicular Bodies*). Suite à cette dégradation, un petit fragment de la chaîne invariante Ii, appelé CLIP (*Class II-associated Invariant chain Peptide*), reste lié à la poche du CMH-II. Ce fragment doit être retiré du CMH-II pour permettre la liaison des peptides antigéniques. La libération du CLIP est facilitée par l'enzyme HLA-DM (connu sous le nom H2-M chez la souris), qui est une protéine codée dans le locus du CMH[165]. HLA-DO (connue sous le nom H2-O chez la souris) est une autre classe de protéines qui supprime l'activité de HLA-DM dans les compartiments d'apprêtement de l'antigène légèrement acides[166]. Après le retrait du CLIP, les molécules du CMH-II naissantes se lient à des peptides antigéniques, quittent les compartiments multivésiculaires et accèdent à la membrane plasmique pour être reconnues par les lymphocytes T $CD4^+$. La reconnaissance du complexe CMH-II/peptide par les LT $CD4^+$ stimule leur activation et leur différenciation en différents sous-types de cellules T auxiliaires. L'activation et la différenciation des LT $CD4^+$ est également médiée par leur interactions avec les LB spécifiques de l'antigène.

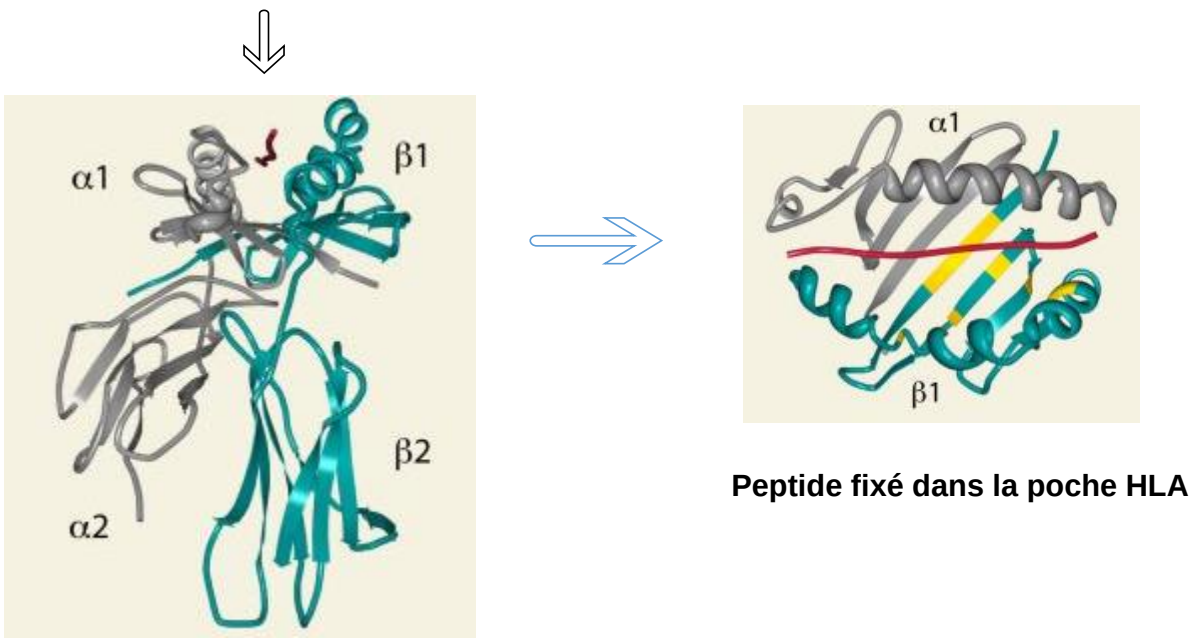


Figure 11 : Structure tridimensionnelle d'une molécule HLA-II

Les molécules du CMH de classe II humaines, aussi appelées HLA de classe II, sont des glycoprotéines constituées d'une chaîne α (en gris) liée de façon non covalente à une chaine β (en bleu). Les régions N-terminales α1 et β1 forment le site de liaison des peptides (en rouge) qui seront présentés au système immunitaire. D'après Blum et al, Annu Rev Immunol 31: 443–473 (2013)

4. La présentation croisée

La présentation croisée des antigènes exogènes par le CMH-I est un phénomène complexe, impliqué à la fois dans l'activation des LTC anti-infectieux et dans l'activation des LTC anti-tumoraux, mais également dans le maintien de la tolérance immunitaire. Elle est en grande partie basée sur la plasticité du système d'endocytose dans les cellules dendritiques. Une présentation croisée réussie, nécessite la présence dans les compartiments cellulaires, où les peptides antigéniques sont produits, d'un peptide pouvant être chargé sur la molécule du CMH-I.

Il existe deux voies principales d'apprêtement de l'antigène lors de la présentation croisée : une voie indépendante du protéasome et de la machinerie TAP et une autre voie dépendante du protéasome et de la machinerie TAP. Dans la voie indépendante du protéasome, connue sous le nom de présentation croisée vacuolaire, des protéases lysosomales acides, parmi lesquels la cathepsine S semble avoir un rôle important[167], génèrent des ligands du CMH-I *via* la voie d'endocytose. Par conséquent, dans cette voie, la liaison des peptides

antigéniques au CMH-I se fait dans des vésicules d'endocytose. La voie de présentation croisée vacuolaire est considérée comme moins efficace que la voie de présentation croisée dépendante du protéasome[168].

Contrairement à la voie de présentation croisée vacuolaire, la voie dépendante du protéasome et de la machinerie TAP implique le transport des antigènes exogènes de la voie d'endocytose vers le cytosol. Une fois dans le cytosol, les antigènes sont digérés par le protéasome, et les peptides générés sont affinés par des peptidases cytosoliques et transportés dans le RE via la machinerie TAP pour accéder aux molécules du CMH-I[168].

5. Le TCR

Le TCR est un complexe multi-protéique, composé de sous-unités possédant des régions de liaison à l'antigène hautement variables associées de manière non-covalente à des sous-unités invariantes chargées de la transduction du signal. Les réarrangements des séquences d'ADN qui codent la région de liaison à l'antigène sont à l'origine de la diversité des complexes TCR/antigène. Chaque TCR a donc une seule spécificité antigénique. Le TCR des LT conventionnels (Figure 12) est un hétérodimère composé de deux chaînes glycoprotéiques (une chaine α et une chaine β). Il est couplé à un complexe CD3, de six sous-unités (CD3γε, CD3δε et CD3ζζ), impliqué dans la transduction du signal. Les sous-unités du CD3 sont essentielles pour la stabilité des chaînes à la membrane plasmique[169]. Ces sous-unités sont dépourvues d'activité kinase, mais peuvent être phosphorylées et induire l'assemblage d'un grand complexe multi-protéique nécessaire à la diversification du signal pour l'expression de multiples gènes. Divers mécanismes contrôlent positivement ou négativement l'activation cellulaire induite par le TCR. Ceux-ci peuvent affecter l'efficacité de la réponse immunitaire et provoquer une auto-immunité[170].

Lors d'une réponse anti-virale ou anti-tumorale, les LT conventionnels utilisent le TCR pour reconnaître des antigènes peptidiques présentés par les molécules de CMH de classe I ou II. La reconnaissance de l'antigène permet une stimulation du TCR, entraînant ainsi l'activation, la prolifération et la différenciation des LT naïfs. Les signaux de la voie de transduction du TCR coopèrent avec des cytokines co-stimulatrices, des chimiokines, des intégrines et des signaux métaboliques pour réguler l'acquisition de la fonction effectrice des LT. Le degré de synergie entre tous ces signaux conduit à des changements dans un ensemble de facteurs de transcription qui détermineront le sous-type précis de chaque LT.

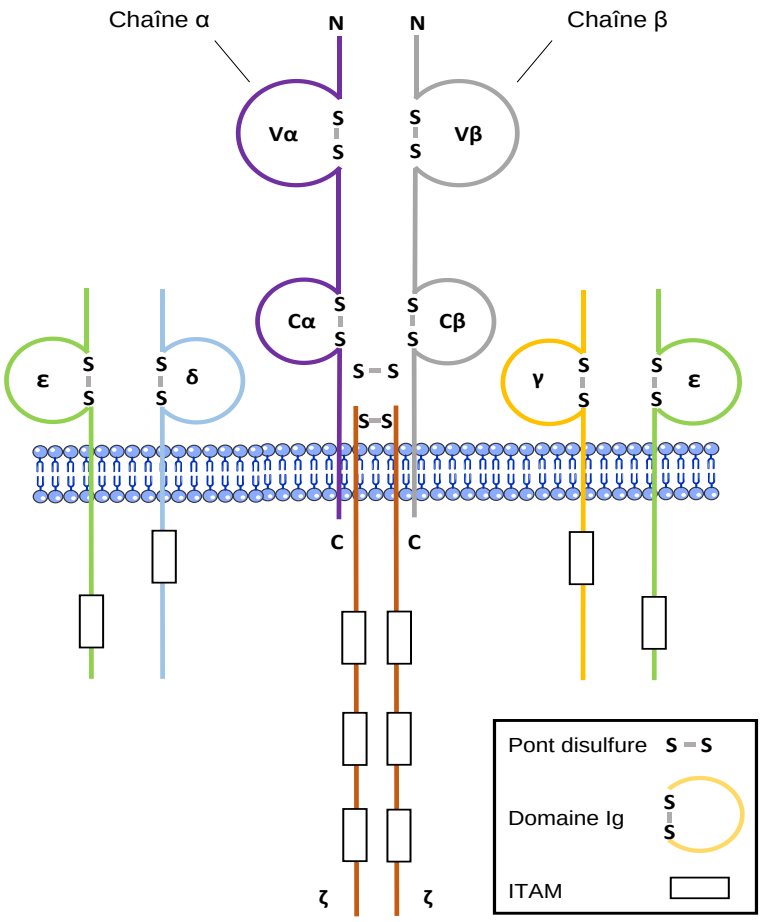


Figure 12 : Représentation du *T Cell Receptor* (TCR)

Représentation schématique du TCR constitué de deux chaînes (α et β), chacune comportant un domaine variable (V) et un domaine constant (C). Ce TCR est associé à la molécule CD3 constituée de 3 sous-unités, une εγ, une δε et une ζζ. C : région C-terminale ; N : région N-terminale ; ITAM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif* ; Ig : Immunoglobuline. D'après Abbas A.K., Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, Ed : Elsevier (2005)

B. Les molécules accessoires (signal 2)

Des molécules accessoires sont exprimées par les CPA. Elles sont responsables du second signal d'activation des LT. Les interactions entre ces molécules et leur récepteur correspondant à la surface des LT favorisent l'expansion clonale, la différenciation et le développement des fonctions effectrices des LT. L'absence de co-stimulation conduit à l'anergie des LT[171]. L'activation des LT est régulée aussi bien par des molécules co-

stimulatrices que par des molécules co-inhibitrices. La régulation étroite de l'expression des molécules co-stimulatrices et des molécules co-inhibitrices, est cruciale pour une réponse immunitaire protectrice efficace et pour éviter l'auto-immunité. Les molécules clés qui orchestrent cette régulation, sur les lymphocytes T, sont des protéines telles que CD28 (co-stimulatrice), CTLA-4 et PD-1 (co-inhibitrices)[169]. La signalisation *via* les TLR (*Toll-Like Receptors*) est également un facteur important lors de l'activation des LT. En effet, la plupart des cytokines qui contrôlent l'activation des lymphocytes sont produites en réponse à une activation des cellules dendritiques et des macrophages *via* les TLR[172].

Les molécules co-stimulatrices, sur les lymphocytes T, fonctionnent souvent comme des adaptateurs et recrutent des molécules de signalisation à la membrane plasmique afin d'amplifier la signalisation du TCR. Les molécules co-stimulatrices appartiennent à deux grandes familles : la famille B7/CD28 et la famille TNF/TNFR. Toutes les molécules appartenant à la famille B7/CD28 sont des membres de la superfamille des immunoglobulines et sont impliquées dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Les membres de la famille TNF/TNFR sont impliqués dans les phases tardives de l'activation des LT et sont induits des heures voire des jours après l'engagement du TCR[173].

La présence d'une co-stimulation efficace est importante pour une bonne réponse immunitaire anti-tumorale. L'absence de co-stimulation dans le microenvironnement tumoral pourrait être responsable de la génération de LT anergiques, entraînant l'absence de réponse immunitaire anti-tumorale efficace[174].

C. Les facteurs solubles (signal 3)

Les cytokines, principaux facteurs solubles impliqués dans le signal 3, sont des « hormones » du système immunitaire présentant des fonctions importantes liées à la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Les cytokines de type I ont une structure commune composée de quatre hélices α. Elles comprennent de nombreuses interleukines, ainsi que certains facteurs de croissance hématopoïétiques. Une famille importante de cytokines de type I est la famille dont les récepteurs partagent une chaîne γ, commune (γ_c). Cette famille comprend les interleukines suivantes : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21. Ces cytokines de type I sont particulièrement importantes pour l'expansion des LT, le développement de leurs fonctions effectrices et mémoires, ainsi que leur survie[175]. Quatre de

ces cytokines (IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21) sont des facteurs de croissance pour les LT. Elles ont néanmoins chacune des fonctions qui leur sont propres.

L'IL-2 est une cytokine pléiotrope, qui joue un rôle dans la différenciation des LT $CD8^+$ naïfs en LTC effecteurs, mais également dans la différenciation optimale des cellules Th1. Elle joue un rôle dans le développement des LTreg, et régule la prolifération et l'apoptose des cellules LT activées[176,177]. L'IL-7 a un rôle central dans le développement des lymphocytes T chez l'homme et chez la souris. Cette cytokine favorise la survie des LT en régulant l'expression de facteurs anti- et pro- apoptotiques. L'IL-15 a un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire des LT $CD8^+$. Cette cytokine soutient la survie ou la prolifération des LT activés[175]. L'IL-21 entraîne l'expansion des LT $CD8^+$, notamment par sa coopération avec l'IL-7 ou l'IL-15[175].

Une réponse immunitaire T anti-tumorale efficace est générée par la rencontre des LT avec un antigène tumoral spécifique de ces LT. La présentation optimale de cet antigène joue un rôle clé dans l'activation des LT anti-tumoraux *via* leur TCR. Les différents signaux émis suite à la stimulation des TCR, l'interaction de molécules accessoires sur les CPA et les LT, les cytokines et les chimiokines non-spécifiques de l'antigène, sont également nécessaires. L'action coordonnée de ces différents acteurs assure l'activation de LT spécifiques d'antigènes exprimés dans la tumeur.

IV. Concept de l'*immunoediting*

Il est maintenant clairement établi que le système immunitaire influence l'évolution des tumeurs chez l'homme. Ce concept, bien que très ancien, n'a été admis que récemment. L'idée que le système immunitaire pourrait protéger l'hôte des tumeurs a été initialement proposée par Paul Ehrlich[178] et officiellement présentée comme l'hypothèse de l'immunosurveillance des cancers près de 50 ans plus tard par Burnet et Thomas[178–180]. Se basant sur une nouvelle compréhension des bases cellulaires de la transplantation et de l'immunité, Burnet et Thomas ont prédit que les lymphocytes pourraient être responsables de l'élimination des cellules tumorales naissantes. Toutefois, lorsque cette prédiction fut testée expérimentalement en utilisant des souris immunodéficientes disponibles à cette période, aucune preuve convaincante d'un tel processus n'a été obtenue[178]. Cette hypothèse fut donc mise de côté. Mais, dans les années 1990, deux séries d'études ont conduit à un regain

d'intérêt pour le concept d'immunosurveillance des cancers. Dans la première série d'études, il a été démontré que la production endogène d'IFN-γ protégeait l'hôte contre le développement des tumeurs spontanées, transplantées ou induites chimiquement[114,181]. Dans la seconde série d'études, il a été observé que les souris dépourvues de perforine ($perf^{-/-}$) étaient plus sensibles aux tumeurs induites par le méthylcholanthrène (MCA) et au développement de tumeurs spontanées par rapport au souris sauvages[114,178]. La perforine est un composant des granules cytolytiques des LTC et des cellules NK, qui joue un rôle important dans la lyse cellulaire induite par les LT $CD8^+$. Ces observations ont démontré que le développement de tumeurs chez la souris peut être contrôlé par des composants du système immunitaire et ont stimulé dès lors la réalisation d'un grand nombre de travaux visant à mieux définir ce processus d'immunosurveillance. Depuis, le nombre d'arguments appuyant le concept d'immunosurveillance n'a cessé d'augmenter. Ainsi, il a été démontré que l'incidence des cancers était plus élevée chez des individus avec des immunodéficiences congénitales ou acquises, ou encore chez des patients subissant un traitement immunosuppresseur par rapport à des individus immunocompétents[178]. Les patients atteints de tumeur peuvent développer spontanément des réponses immunitaires innées et adaptatives contre leur tumeur, et la présence de lymphocytes dans la tumeur peut être un indicateur du pronostic et de la survie globale du patient. Dans de larges cohortes de patients ayant un cancer colorectal, une densité importante de lymphocytes T (LT) infiltrant la tumeur a été associée à un bon pronostic[182]. Ceci suggère que la réponse immunitaire de l'hôte est d'une importance capitale dans le contrôle de la progression des tumeurs.

Néanmoins, malgré cette immunosurveillance, des individus immunocompétents développent des tumeurs. Le concept d'immunosurveillance reste donc insuffisant pour expliquer tous les mécanismes de l'immunité anti-tumorale. L'immunosurveillance de la tumeur a donc été intégrée dans un concept plus général d'« immunoediting » dans lequel le système immunitaire sculpte la tumeur. L'« immunoediting » comporte 3 phases principales : (1) une phase d'élimination qui correspond à l'immunosurveillance, (2) une phase d'équilibre pendant laquelle la tumeur n'est pas complètement détruite et (3) une phase d'échappement qui correspond à la croissance ultime de la tumeur[178].

A. Phase d'élimination

La phase d'élimination représente le concept original d'immunosurveillance du cancer. Si cette phase éradique avec succès une tumeur en développement, elle représente le

processus complet d'*immunoediting* sans progression vers les phases ultérieures. Le système immunitaire agit comme un suppresseur de tumeur extrinsèque, lorsque les différents systèmes intrinsèques de suppression de tumeur présents à l'intérieur des cellules tumorales ont été inefficaces. Le rejet d'une tumeur en développement, nécessite une réponse immunitaire impliquant à la fois les composants de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. L'initiation de la réponse immunitaire anti-tumorale se produit lorsque les cellules du système immunitaire inné détectent *via* différents signaux la présence d'une tumeur qui se développe. Le remodelage du stroma induit au cours de l'angiogenèse ou lors d'autres processus impliqués dans le développement tumoral permet la production de molécules pro-inflammatoires par les cellules tumorales, favorisant le recrutement des cellules du système immunitaire inné[178]. Une fois recrutés au sein de la masse tumorale en développement, les cellules NKT, les LTγδ, les cellules NK, et /ou les macrophages peuvent reconnaître des molécules exprimées par les cellules tumorales. Après avoir reconnu les cellules tumorales, ces cellules exercent leur action anti-tumorale par les différents mécanismes décrits précédemment. Suite à l'intervention des cellules de l'immunité innée, des antigènes tumoraux dérivés de cellules tumorales mortes sont libérés, permettant le recrutement des composants du système immunitaire adaptatif[178]. Les cellules dendritiques activées captent les antigènes tumoraux et migrent vers les ganglions lymphatiques où elles induisent l'activation des LT naïfs en LT spécifiques, notamment en LT $CD4^+$ auxiliaires Th1. Les cellules Th1 facilitent le développement de LTC induit par la présentation croisée de peptides tumoraux sur les molécules du CMH-I des cellules dendritiques[168]. Le développement de l'immunité adaptative spécifique fournit ainsi à l'hôte la capacité d'éliminer complètement la tumeur en développement.

B. Phase d'équilibre

Dans la phase d'équilibre, le système immunitaire de l'hôte et les cellules tumorales qui ont survécu à la phase d'élimination entrent dans un équilibre dynamique, dans lequel les cellules immunitaires exercent continuellement sur la tumeur une pression suffisante pour la contenir, mais pas pour l'éliminer. La phase d'équilibre est probablement la plus longue des trois phases et peut se dérouler pendant plusieurs années chez l'homme. En effet, il a été estimé que pour de nombreuses tumeurs solides, il pouvait y avoir un délai de 20 ans entre l'exposition aux carcinogènes et la détection clinique de la tumeur[183]. Pendant la phase d'équilibre, l'hétérogénéité et l'instabilité génétique des cellules tumorales qui survivent à la

phase d'élimination sont probablement les principaux avantages qui permettent à ces cellules de résister au système immunitaire de l'hôte[178]. Finalement, la phase d'équilibre va aboutir à l'émergence d'une nouvelle population de clones de la tumeur à l'immunogénicité réduite, insensible aux signaux du système immunitaire.

C. Phase d'échappement

Dans la phase d'échappement, les variants tumoraux ayant survécu et acquis une insensibilité à la détection et/ou à l'élimination par le système immunitaire grâce à des modifications génétiques ou épigénétiques commencent à proliférer de façon incontrôlée. C'est à cette étape qu'une masse tumorale devient cliniquement détectable[180].

L'échappement des tumeurs au système immunitaire est une étape importante dans la progression des tumeurs malignes. Il est également impliqué dans l'échec de certaines stratégies d'immunothérapie en clinique. Les tumeurs développent de nombreuses stratégies pour échapper à la surveillance immunitaire ou se propager dans l'organisme sous forme de métastases. Ces stratégies peuvent être regroupées en trois grandes catégories : la perte d'antigénicité (absence de reconnaissance des cellules tumorales), la perte d'immunogénicité (insensibilité au système immunitaire) et la mise en place d'un environnement immunosuppresseur. La perte d'antigénicité peut être obtenue grâce à l'acquisition de défauts dans l'apprêtement et la présentation de l'antigène, ou à la perte d'antigènes tumoraux immunogènes conduisant à une absence de peptides immunogènes présentés sur les molécules du CMH. Les cellules malignes peuvent aussi acquérir des propriétés immunosuppressives supplémentaires, telles que l'expression de PD-L1 ou la sécrétion de cytokines immunosuppressives (par exemple IL-10 et TGFβ), ce qui réduit encore davantage leur immunogénicité. Les tumeurs peuvent aussi échapper à l'élimination par le système immunitaire en favorisant un microenvironnement immunosuppresseur.

1. La perte d'antigénicité

La capacité du système immunitaire à distinguer les cellules normales des cellules tumorales est fondamentale pour une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Elle repose en partie sur la reconnaissance des cellules tumorales ayant une antigénicité suffisante. Les tumeurs peuvent exprimer une variété d'antigènes non mutés et mutés qui ont le potentiel d'induire des réponses immunitaires spécifiques de la tumeur[184]. Afin d'échapper à

l'élimination par le système immunitaire, les cellules tumorales peuvent perdre leur antigénicité.

La perte de l'antigénicité peut survenir en raison de la sélection immunitaire des cellules cancéreuses, qui conduit à la perte ou à la mutation des antigènes tumoraux immunogènes. Elle peut être également due à l'acquisition de divers défauts lors du processus de présentation des antigènes (par exemple, la perte d'expression par délétion génique de molécules du CMH-I, ou un dysfonctionnement de la machinerie TAP[185]). Par conséquent, la connaissance de l'antigénicité des cellules tumorales pourrait renseigner sur la susceptibilité potentielle d'une tumeur à être éliminée par les LT endogènes.

Même si une tumeur exprime des antigènes immunogènes, la détection immunitaire des cellules tumorales dépend de leur capacité à présenter l'antigène dans le contexte des molécules du CMH. Les tumeurs qui ont perdu l'expression du CMH ou acquis d'autres défauts de présentation de l'antigène peuvent donc échapper à l'élimination par des LTC spécifiques de la tumeur. Une baisse ou une perte de l'expression des molécules du CMH-I a été observée dans environ 20 à 60% des tumeurs solides les plus fréquentes[186], telles que les mélanomes et les cancers du poumon, du sein, du rein, de la prostate ou de la vessie. En outre, les changements dans l'expression du CMH observés sont corrélés avec l'évolution clinique dans certaines tumeurs malignes. Au-delà des altérations de l'expression, par délétion génique, des molécules du CMH, les composants de la machinerie de présentation de l'antigène peuvent également être dérégulés dans les tumeurs humaines au niveau épigénétique, transcriptionnel, ou post-transcriptionnel[186].

Depuis plus d'une décennie, il est admis qu'une machinerie TAP fonctionnelle et une expression des molécules du CMH des cellules tumorales sont cruciales pour l'immunité anti-tumorale dépendante des LT. Certaines études ont montré que l'expression des molécules HLA-I par les cellules tumorales pouvaient prédire l'efficacité de l'immunothérapie dans le cancer de la vessie et de la chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire[187,188]. Plus récemment, il a été montré que l'expression des molécules HLA-II était un facteur pronostique favorable pour le cancer colorectal[189]. Ces diverses données mettent en avant l'importance de tester la présence des molécules du CMH de classes I et II dans le tissu tumoral comme mesure de l'antigénicité afin d'identifier les patients les plus susceptibles de bénéficier d'une immunothérapie à base de LT. Il serait également intéressant d'identifier les antigènes tumoraux présentés par ces molécules pouvant être des cibles efficaces pour

l'immunothérapie. La connaissance de l'antigénicité de la tumeur d'un patient pourrait donc permettre de proposer de nouvelles stratégies d'immunothérapie personnalisée efficace.

2. La perte d'immunogénicité

Les tumeurs qui conservent une antigénicité suffisante pour la reconnaissance immunitaire peuvent échapper à l'élimination en diminuant leur immunogénicité. Par exemple, l'IFN-γ produit par les lymphocytes infiltrant les tumeurs peut induire l'expression de la molécule PD-L1 à la surface des cellules tumorales[190]. PD-L1 et PD-L2 sont des ligands pour PD-1, un récepteur communément exprimé sur les LT activés. L'engagement du récepteur PD-1 avec ses ligands induit un signal d'inhibition à l'égard des LT, inhibant ainsi les fonctions effectrices de ces derniers. Dans une grande variété de tumeurs, l'expression membranaire de PD-L1 par les cellules tumorales a été fortement corrélée avec la présence de régions riches en lymphocytes d'une tumeur mais aussi avec des réponses favorables aux immunothérapies utilisant des anticorps anti-PD-1[191]. Ces résultats suggèrent que l'expression de PD-L1 pourrait, dans ces cancers, être utilisée pour définir si une tumeur sera sensible à une immunothérapie anti-PD-1. Cependant, toutes les tumeurs exprimant PD-L1 ne sont pas associées à des infiltrats immunitaires et certaines tumeurs exprimant PD-L1 ne répondent pas aux immunothérapies anti-PD-1[190].

D'autres molécules de contrôle de la réponse immunitaire (par exemple, la galectine 9) peuvent être exprimées sur les cellules tumorales et sur les cellules stromales environnantes. L'expression de différents régulateurs négatifs présents sur les lymphocytes infiltrant les tumeurs (par exemple PD-1, LAG-3, TIM-3, VISTA, CD244, CD160 et BTLA) peut également être observée. Comme pour l'axe PD-1/PD-L1, ces voies moléculaires vont agir pour réguler l'immunogénicité des tumeurs ou inhiber les fonctions cellulaires des LT infiltrant les tumeurs[185].

3. Le microenvironnement tumoral

Certaines tumeurs peuvent conserver l'antigénicité et l'immunogénicité suffisante pour la reconnaissance par des LT spécifiques de la tumeur, mais échapper à l'élimination immunitaire en générant un microenvironnement immunosuppresseur. Ce processus se développe grâce au recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives ou à la sécrétion de cytokines immunosuppressives, favorisant la progression tumorale.

a. Cellules immunosuppressives

Au cours de la progression de la tumeur, les cellules immunosuppressives sont mobilisées en réponse à des cytokines induites par la tumeur, comme le TGF-β. Les LTreg, les cellules myéloïdes suppressives, les macrophages associés à la tumeur, les cellules dendritiques tolérogènes, les Th17 et les Breg sont des cellules immunosuppressives clés qui favorisent la progression tumorale[192].

Les LTreg jouent un rôle important dans la progression tumorale et l'échappement au système immunitaire. Dans les conditions physiologiques, les LTreg limitent les réponses auto-immunes et maintiennent l'homéostasie de la réponse immunitaire. Les LTreg peuvent inhiber la fonction des LT par la production de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF-β, l'expression de molécules co-inhibitrices telles que CTLA-4, PD-1 et PD-L1, ou la consommation d'IL-2. Les LTreg peuvent également supprimer la présentation de l'antigène et interférer avec la fonction des LTC en inhibant la libération des granules cytolytiques pendant la progression tumorale[193].

Les cellules myéloïdes suppressives (*MDSC*s) peuvent faciliter l'échappement immunitaire par le biais de plusieurs mécanismes. Par exemple, les *MDSC*s infiltrant les tumeurs altèrent la fonction des LT, des cellules NK, et des cellules dendritiques, facilitant ainsi l'échappement tumoral. L'action pro-tumorale des *MDSCs* est régulée par la protéine CHOP (*Cellular stress sensor C/EBP-Homologous Protein*) et l'IL-6. Les *MDSCs* peuvent aussi favoriser l'échappement immunitaire en produisant des taux élevés d'IL-10, en supprimant l'activation des LT $CD4^+$ et des LT $CD8^+$, et en régulant de façon négative l'expression de la L-sélectine sur les cellules T naïves circulantes [192].

Les macrophages associés à la tumeur peuvent inhiber les réponses immunitaires anti-tumorales des LT $CD8^+$ pour faciliter l'échappement de la tumeur au système immunitaire, soit directement par l'expression de ligands tels que PD-L1 et B7-H4, ou indirectement par le recrutement de LTreg grâce à CCL22[192].

D'autres cellules immunosuppressives sont également impliquées dans l'échappement de la tumeur au système immunitaire. Par exemple, les neutrophiles peuvent supprimer la fonction des LT $CD8^+$, en sécrétant de l'arginase 1 pour dégrader l'arginine extracellulaire, un facteur nécessaire au bon fonctionnement des LT. Des cellules dendritiques régulatrices peuvent être induites par les tumeurs, et participer à la suppression de la réponse immunitaire

anti-tumorale. Des cellules dendritiques tolérogènes (exprimant de faibles niveaux de molécules du CMH et de molécules de costimulation) peuvent également participer à l'échappement immunitaire[192].

Les cellules immunosuppressives ont un rôle fonctionnel dans l'échappement immunitaire par la production de cytokines immunosuppressives et génèrent un environnement immunosuppresseur. Par conséquent, identifier l'origine et les caractéristiques fonctionnelles des cellules immunosuppressives aidera à concevoir de nouvelles approches d'immunothérapie anti-cancéreuse en bloquant l'échappement immunitaire.

b. Cytokines immunosuppressives

Les tumeurs peuvent également échapper à la surveillance immunitaire en produisant des cytokines immunosuppressives capables d'altérer la fonction des LTC. Le TGF-β est un médiateur clé de cette action. En outre, le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6, le CSF-1, l'IL-8, l'IL-10 et l'IFN de type I peuvent également contribuer de manière significative à la croissance des cellules tumorales[194,195]. En plus des cytokines immunosuppressives, d'autres facteurs tels que le VEGF produit par les tumeurs inhibent la différenciation des progéniteurs des cellules dendritiques, ce qui affecte la présentation efficace des antigènes. Le VEGF, l'IL-10 et le TGF-β sont également connus pour inhiber la maturation des cellules dendritiques[196,197]. Les cellules dendritiques conservant donc un phénotype immature sont tolérogènes car elles ne présentent pas l'antigène dans un contexte approprié, avec une costimulation appropriée aux LT. Des enzymes immunosuppressives telles que l'IDO (Indoléamine 2,3-dioxygénase) et l'arginase peuvent également contribuer de manière significative à la progression tumorale par des actions directes sur la prolifération des cellules tumorales, par l'induction de la tolérance, ou par la suppression de LT[197].

Le système immunitaire joue donc un rôle central dans la biologie de la tumeur. Les stratégies qui visent à restaurer la capacité du système immunitaire à reconnaître et à éliminer les cellules malignes ont produit des résultats cliniques bénéfiques, mais seulement pour certains patients. Les traitements mettant en jeu l'immunité doivent pouvoir tenir compte de la capacité des tumeurs à s'adapter à la pression immunitaire non seulement *via* la perte de leur antigénicité et de leur immunogénicité intrinsèques, mais aussi *via* la génération d'un microenvironnement immunosuppresseur. Des stratégies thérapeutiques distinctes, en fonction des mécanismes d'échappement immunitaire exploités par la tumeur, peuvent être

requises pour restaurer une immunosurveillance adéquate des cancers. L'identification des antigènes exprimés par les tumeurs, la détermination de leur immunogénicité et l'obtention d'un microenvironnement tumoral immunostimulant sont donc nécessaires pour le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie anti-tumorale, spécifiques et efficaces.

Partie II : Immunothérapie des cancers

Malgré les progrès significatifs des traitements anticancéreux (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, hormonothérapie et thérapies ciblées), le cancer reste encore la première cause de décès en France avec près de 150 000 décès estimés en 2015. Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer le pronostic des patients atteints de différentes tumeurs. L'utilisation thérapeutique récente des anticorps anti-« checkpoints », en particulier les anti-PD-1, anti-PD-L1 et anti-CTLA-4 qui renforcent la réponse immunitaire cellulaire naturelle anti-tumorale[6,198–200], et les succès des approches d'immunothérapie cellulaire adoptive par transfert de LT spécifiques d'antigènes tumoraux dans les mélanomes[7], ont propulsé l'immunothérapie au rang des traitements innovants et prometteurs du cancer, en plus des approches traditionnelles.

La capacité du système immunitaire à reconnaître et à éliminer le cancer est à la base de l'immunothérapie du cancer. L'immunothérapie vise à induire, améliorer ou amplifier les réponses immunitaires contre la tumeur et empêcher la croissance tumorale. Au cours des trois dernières décennies, l'immunothérapie est devenue une réalité clinique[201–203]. En fonction du mécanisme d'action, il existe différentes stratégies d'immunothérapie. Pour la classification des différents types d'immunothérapie, nous allons nous baser sur la revue de Galluzzi *et al.* parue dans *Oncotarget* en 2015. C'est l'une des plus belles revues récentes faisant la synthèse de la classification des différentes stratégies d'immunothérapie. Elle a été réalisée par un consortium regroupant 104 laboratoires français, européens et américains. Les auteurs de cette revue sont des « noms » qui font référence dans le domaine de l'immunothérapie anti-tumorale. Cette revue est d'autant plus intéressante qu'elle présente de manière critique la classification que nous qualifierons d'historique des diverses formes d'immunothérapie anticancéreuse.

Les immunothérapies anticancéreuses sont généralement classées comme « passives » ou « actives » en fonction de leur capacité à (ré)activer le système immunitaire de l'hôte contre les cellules tumorales. Sur cette base, l'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcM) ciblant les cellules tumorales et le transfert adoptif de LT sont considérés comme des formes passives d'immunothérapie, car ils sont doués d'une activité anti-tumorale intrinsèque. A l'inverse, les vaccins anticancéreux et les anticorps anti-« *checkpoints* » exerçant des effets anti-tumoraux en permettant l'engagement du système immunitaire de l'hôte, constituent des exemples clairs d'immunothérapie active.

L'immunothérapie passive peut être basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules tumorales ou contre la vascularisation de la tumeur. Le terme d'immunothérapie passive est tout de même discutable, car les approches passives mettent en jeu l'immunité du patient. Dans leur mécanisme d'action, les AcM mettent en jeu la lyse cellulaire dépendante du complément, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, le blocage d'une voie métabolique, et induisent des signaux pro-apoptotiques dans les cellules cibles. Tous ces mécanismes mettent en jeu l'immunité du patient même si historiquement et dans un souci de simplification, la classification « passive » et « active » est conservée. Dans l'immunothérapie passive, la thérapie cellulaire adoptive a été également incluse mais cela est quand même biaisé parce qu'il faut préciser que dans cette stratégie, c'est bien les LT du patient qui sont éduqués *ex vivo* et, quand ils sont injectés, ces LT vont également mettre en jeu le système immunitaire du patient. Ce n'est pas seulement les cellules immunitaires injectées qui agissent, mais c'est également un équilibre qui est rompu entre la tumeur et le système immunitaire du patient, induisant donc une réponse effectrice active *in vivo*. Nous rapporterons cette approche à la fin du chapitre « immunothérapie », en dehors de la partie « immunothérapie passive ». L'immunothérapie active, quant à elle, est basée sur l'administration de cellules immunitaires ou sur l'administration de molécules immunostimulantes (telles que les cytokines), ou encore sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux inhibant la réponse immuno-modulatrice négative. Qu'elle soit passive ou active, l'immunothérapie spécifique du cancer repose sur le choix des antigènes tumoraux. Le choix des antigènes à utiliser pour l'immunothérapie reste donc une question cruciale et difficile. Les antigènes sont choisis pour une immunothérapie selon certains critères, notamment la spécificité pour la tumeur, le niveau d'expression, le rôle dans la carcinogenèse, une absence d'auto-immunité, ou encore la capacité de déclencher une réponse immunitaire spécifique *in vivo*.

I. Immunothérapie passive

L'activation des lymphocytes B conduit à la production d'anticorps. Ces anticorps peuvent se lier à des antigènes immunogènes, exprimés à la surface des cellules tumorales, et initier la lyse cellulaire dépendante du complément, ou réaliser des ponts entre certaines cellules du système immunitaire inné (les cellules NK ou les macrophages) et les cellules tumorales pour induire la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. Ces anticorps

peuvent également interférer avec la croissance des cellules tumorales en bloquant la survie ou en induisant des signaux pro-apoptotiques. Enfin, ils peuvent augmenter l'immunogénicité de la tumeur en facilitant l'absorption et la présentation des antigènes tumoraux par les CPA. L'amélioration des réponses des lymphocytes B *in vivo*, ou la génération *in vitro* de grandes quantités d'anticorps peut donc favoriser la réponse anti-tumorale.

L'idée d'utiliser des anticorps pour cibler sélectivement les tumeurs a été proposée par Paul Ehrlich il y a plus d'un siècle[204]. L'avènement de la technologie des hybridomes en 1975 a permis la production des anticorps monoclonaux (AcM)[205]. Les progrès biotechnologiques réalisés depuis ce temps ont permis le développement d'AcM chimériques, humanisés ou entièrement humains. Au cours de la dernière décennie, l'efficacité des AcM pour le traitement de patients atteints de cancer a été de plus en plus reconnue. Plusieurs de ces AcM ont été approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement des cancers. L'immunothérapie passive basée sur l'utilisation d'AcM ciblant la tumeur est la mieux décrite, et est largement utilisée en clinique[206–208]. Un grand nombre de ces anticorps reconnaissent sélectivement les cellules cancéreuses en fonction de l'expression de leurs antigènes par la tumeur[184,209]. Les AcM peuvent aussi modifier spécifiquement les fonctions de signalisation des récepteurs exprimés à la surface des cellules malignes [210,211] et neutraliser les signaux trophiques produits par les cellules malignes ou par des composants du stroma[212,213]. Les AcM ciblant les tumeurs peuvent être classés en 6 grandes catégories distinctes en fonction de leur rôle ou mode d'action (Tableau 1). La première catégorie est composée des AcM inhibant directement les voies de signalisation requises pour la survie ou la progression des cellules tumorales. Le cetuximab et le panitumumab sont deux AcM faisant partie de cette catégorie. Le cetuximab est une IgG1 chimérique qui inhibe l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Il est approuvé par la FDA pour le traitement du cancer de la tête et du cou, et le cancer colorectal métastatique[211,214,215]. Le panitumumab, quant à lui, est une IgG2 anti-EGFR entièrement humaine qui se lie avec une affinité élevée à l'EGFR[211,216,217]. Des essais cliniques ont montré une activité anti-tumorale du panitumumab chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique[218,219]. Ces AcM peuvent neutraliser également les facteurs trophiques libérés par le stroma ou les composants de la masse tumorale. Ils inhibent donc indirectement la croissance tumorale. C'est le cas par exemple du bévacizumab, qui bloque le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Il est actuellement utilisé pour le traitement des cancers colorectaux, du sein, du rein et du poumon, en complément des méthodes classiques (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapies

conventionnelles)[212,213,220,221]. La seconde catégorie est composée d'AcM activant les récepteurs pro-apoptotiques préférentiellement exprimés par les cellules tumorales. On peut citer l'exemple du tigatuzumab, CS-1008[210,222], un AcM spécifique d'une protéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs au TNF : TNFRSF10B (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10B* ; mieux connu sous le nom de TRAIL-R2 ou DR5). La troisième catégorie comprend les immunoconjugués. Ce sont des AcM spécifiques d'antigènes associés à la tumeur et couplés à des toxines ou radionucléides. Le gemtuzumab ozogamicine, un anti-CD33 conjugué à la calichéamicine, actuellement utilisé pour le traitement de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë[223,224] fait partie de cette catégorie. La quatrième catégorie comprend les AcM se liant à des antigènes exprimés à la surface des cellules tumorales, qui entraînent le déclenchement d'une réponse immunitaire innée conduisant à une opsonisation des cellules tumorales. Cette réponse est liée à des mécanismes tels que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, la phagocytose cellulaire dépendante de l'anticorps et la cytotoxicité dépendante du complément. C'est le cas du rituximab, un AcM spécifique du CD20, qui est actuellement utilisé pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et du lymphome non hodgkinien[225,226]. La dernière catégorie correspond aux anticorps bispécifiques ou *BiTEs* (*Bispecific T-cell Engager*s). Ce sont des protéines chimériques constituées de deux scFv (*single-chain Fragments variable*) dérivées de deux AcM distincts. L'un cible un antigène associé à la tumeur et l'autre un antigène de surface d'un LT. Le blinatumomab en est un exemple. C'est un *BiTE* anti-CD19 et anti-CD3 récemment approuvé pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë[227–230].

L'action des AcM opsonisants et des *BiTEs* repose sur le système immunitaire de l'hôte, ce qui implique que ces molécules devraient être considérées comme des immunothérapies actives. Par contre, les deux premières catégories d'AcM sont dotées de propriétés anti-tumorales intrinsèques. Cependant, de plus en plus de preuves indiquent que le réel potentiel anti-tumoral de ces molécules ne reflète pas simplement leur activité inhibitrice directe sur la tumeur, mais implique également, au moins dans une certaine mesure, l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale[222]. Par exemple, le cetuximab inhibe non seulement la signalisation de l'EGFR[211,214,215], mais favorise également l'*ADCC* (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*)[222]. De même, le bevacizumab exerce non seulement des effets anti-angiogéniques, mais stimule aussi l'infiltration de LB et de LT, tout en inhibant les LTreg $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$[222]. Les AcM ciblant les tumeurs fonctionnent donc en fait comme des immunothérapies actives.

Anticorps monoclonal	Type	Cible	Type de tumeur
Alemtuzumab (Campath®)	IgG1 humanisée	CD52	Leucémie lymphoïde chronique
Bevacizumab (Avastin®)	IgG1 humanisée	VEGFA	Glioblastome, cancer colorectal, cancer rénal, et cancer du poumon
Brentuximab vedotin (Adcetris®)	IgG1 chimérique	CD30	Lymphome hodgkinien
Blinatumumab (Blincyto®)	anticorps bispécifique	CD3 et CD19	Leucémie aiguë lymphoblastique
Catumaxomab (Removab®)	hybride de rat/souris	CD3 EPCAM	Ascites malignes chez les patients atteints de cancer $EPCAM^{+}$
Cetuximab (Erbitux®)	IgG1 chimérique	EGFR	Cancer de la tête et du cou, cancer colorectal
Denosumab (Xgeva®)	IgG2 humaine	RANKL	Tumeur osseuse
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)	IgG4 humanisée	CD33	Leucémie myéloïde aiguë
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®)	IgG1 murine	CD20	Lymphome non hodgkinien
Panitumumab (Vectibix®)	IgG2 humaine	EGFR	Cancer colorectal métastatique
Pertuzumab (Perjeta®)	IgG1 humanisée	HER2	Cancer du sein
Obinutuzumab (Gazyvaro®)	IgG1 humaine	CD20	Leucémie lymphoïde chronique
Ofatumumab (Arzerra®)	IgG1 humaine	CD20	Leucémie lymphoïde chronique
Ramucirumab (Cyranza®)	IgG1 humaine	VEGFR2	Cancer gastrique
Rituximab (Mabthera®)	IgG1 chimérique	CD20	Lymphome non hodgkinien Leucémie lymphoïde chronique
Trastuzumab (Herceptin®)	IgG1 humanisée	HER2	Cancer du sein, cancer gastrique
Tositumomab (Bexxar®)	IgG1 humaine	CD20	Lymphome non hodgkinien

Tableau 1 : Anticorps monoclonaux utilisés dans le cadre d'une immunothérapie passive et approuvés par la *FDA* (*Food and Drug Administration*)

EGFR, Epidermal Growth Factor Recepteur ; HER-2, Human Epidermal Receptor 2 ; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor. D'après Galluzi et al, Oncotarget, Vol 5, No 24 (2015)

II. Immunothérapie active

L'immunothérapie active peut être non spécifique ou spécifique d'antigènes tumoraux. L'immunothérapie cellulaire non spécifique permet l'activation du système immunitaire par des molécules immunostimulantes (telles que les cytokines) ou des molécules inhibant la réponse immuno-modulatrice négative. L'immunothérapie cellulaire spécifique permet l'activation du système immunitaire en ciblant des antigènes tumoraux.

A. Immunothérapie active non spécifique d'antigènes tumoraux

1. Cytokines immunostimulantes

Les cytokines immunostimulantes sont généralement utilisées comme adjuvants immunologiques pour amplifier le potentiel immunologique d'autres agents immunothérapeutiques tels que les vaccins tumoraux et les inhibiteurs de « checkpoint ». Elles peuvent se présenter sous forme de molécules recombinantes ou codées par des vecteurs[231]. Toutefois, il existe des exceptions comme, par exemple, l'IFN-α2b (Intron A®) et l'IL-2 (Aldesleukine® et Proleukin®), utilisés en monothérapie chez des patients atteints de mélanome (Tableau 2)[231–233]. L'IFN-α2b est actuellement approuvé par la *FDA* et l'*EMA* (*European Medecines Agency*) pour le traitement de diverses tumeurs (lymphome folliculaire, myélome multiple, mélanome, etc.), et l'IL-2 pour le traitement des mélanomes métastatiques et des carcinomes rénaux[231].

2. Les anticorps monoclonaux immunomodulateurs

Les AcM immunomodulateurs diffèrent des AcM ciblant la tumeur parce qu'ils interagissent directement avec les composants solubles ou cellulaires du système immunitaire. Le plus souvent, les AcM immunomodulateurs activent les LT ou les cellules NK. L'efficacité des AcM immunomodulateurs repose sur le déclenchement ou la réactivation d'une réponse immunitaire préexistante contre les cellules tumorales[234]. Jusqu'à présent, cela a été réalisé grâce à trois stratégies principales :

(1) le blocage des récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4[235] et PD-1 (*Programmed cell Death-1*) [236], tous les deux exprimés par les LT activés, ou le ligand de PD-1 (PD-L1), ou encore le blocage de plusieurs récepteurs de la famille des *KIRs* (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*), qui se trouvent à la surface des cellules NK[234],

(2) l'activation de récepteurs de co-stimulation tels que TNFRSF4[237] (mieux connu sous le nom d'OX40) et TNFRSF18[238] (mieux connu sous le nom de GITR), qui sont exprimés par les LT $CD4^+$ et les LT $CD8^+$ activés,

(3) et la neutralisation des facteurs immunosuppresseurs solubles, tels que le TGF-β1[239].

Chez l'homme, trois AcM immunomodulateurs ont été approuvés par la FDA : l'ipilimumab (Yervoy®), un anti-CTLA-4 approuvé pour le traitement des mélanomes métastatiques, le pembrolizumab (Keytruda®) et le nivolumab (Opvido®), deux anti-PD-1 utilisés chez des patients atteints de mélanome (Tableau 2).

B. Immunothérapie cellulaire spécifique d'antigènes tumoraux

1. Vaccination anti-tumorale

a. Injection de cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont un impact significatif sur l'oncogenèse, la progression tumorale et la réponse au traitement[240]. Cela a été démontré dans divers modèles précliniques de tumeurs mais aussi dans des études cliniques, corrélant les niveaux intra-tumoraux de l'ensemble des cellules dendritiques ou de certaines sous-populations de cellules dendritiques à un bon ou à un mauvais pronostic[241]. Plusieurs formes d'immunothérapie à base de cellules dendritiques ont été développées. La plupart sont basées sur l'isolement des monocytes circulants des patients. Ces monocytes sont ensuite amplifiés et différenciés *ex vivo*, en présence d'agents qui favorisent la maturation des cellules dendritiques, tels que le GM-CSF[242]. Les cellules dendritiques matures ainsi obtenues sont réinjectées après avoir été :

(1) soit exposées à des antigènes tumoraux, tels que des peptides dérivés d'antigènes associés à la tumeur[243],

(2) soit transduites avec des ARNm codant des antigènes tumoraux spécifiques[244],

(3) soit transfectées avec des vecteurs codant des antigènes tumoraux spécifiques[245],

(4) soit mises en coculture avec des lysats de cellules tumorales (autologues ou hétérologues)[246],

(5) soit encore transfectées avec de l'ARNm dérivé de cellules tumorales[247].

Le but de toutes ces approches est de charger les cellules dendritiques *ex vivo* avec des antigènes tumoraux ou des molécules codant des antigènes tumoraux, afin qu'elles soient en

mesure d'initier des réponses immunitaires après leur réinjection. En 2010, le Sipuleucel-T® (également connu sous le nom de Provenge®), un produit cellulaire contenant une proportion importante de cellules dendritiques (partiellement immatures) a été approuvé par la *FDA* pour le traitement du cancer métastatique de la prostate résistant au traitement hormonal (Tableau 2)[248].

b. Vaccins à base de protéines, d'ARN ou d'ADN

Les cellules dendritiques et autres CPA peuvent être la cible de vaccins anti-cancéreux à base de protéines. Des antigènes entiers recombinants ou des peptides dérivés de ceux-ci sont administrés à des patients, le plus souvent par voie intramusculaire, sous-cutanée ou intradermique, conjointement avec un ou plusieurs agents immunostimulants couramment connus sous le nom d'adjuvants (qui favorisent la maturation des cellules dendritiques). L'objectif de cette approche est de rendre les cellules dendritiques résidentes (ou les autres CPA) capables de présenter des épitopes dérivés d'antigènes tumoraux tout en induisant leur maturation[222,249]. L'efficacité de cette approche dépend en partie de la taille des antigènes utilisés[250]. De façon générale, l'activité thérapeutique de longs peptides synthétiques est supérieure à celle de courts peptides, en particulier lorsqu'ils comprennent des épitopes reconnus par des LTC et des LT auxiliaires ou lorsqu'ils sont conjugués à des adjuvants efficaces[222,250,251].

Les vaccins anti-cancéreux à base d'ARN ou d'ADN utilisent des constructions codant un ou plusieurs antigènes tumoraux. Ces vaccins sont administrés par voie sous-cutanée ou intramusculaire sous la forme d'ARN ou d'ADN nu, ce qui entraîne leur absorption par les CPA, principalement les cellules dendritiques. Les antigènes tumoraux sont exprimés par les CPA et présentés sur des molécules du CMH-I à des LT spécifiques, induisant ainsi une réponse immunitaire anti-tumorale[252].

Chez l'homme, aucun vaccin anti-cancéreux à base de peptide ou à base d'ARN ou d'ADN n'est actuellement approuvé par la *FDA* ou l'*EMA*[253].

Immunothérapie cellulaire	Agent	Type de tumeur
Cytokines immunostimulantes	IL-2	Mélanome Carcinome rénal
	IFN-α2a	Leucémie myéloïde chronique Leucémie à tricholeucocytes Mélanome
	IFN-α2b	Tumeurs hématologiques Tumeurs solides
Anticorps immunostimulant	Ipilimumab	Mélanome
	Nivolumab	Mélanome
	Pembrolizumab	Mélanome
Vaccin peptidique	Vitespen	Carcinome rénal
Vaccin à base de cellules dendritiques	Sipuleucel-T	Cancer de la prostate

Tableau 2 : Immunothérapie active actuellement approuvée par différentes agences de régulation dans le monde. D'après Galluzzi et al, Oncotarget, Vol.5, No. 24 (2015)

III. Immunothérapie cellulaire adoptive

1. Différents types d'immunothérapie cellulaire adoptive

L'immunothérapie cellulaire adoptive (ICA) des patients atteints de cancer repose sur l'expansion *in vitro* de lymphocytes qui reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales et les éliminent *in vivo* après réinjection. C'est une approche thérapeutique qui présente un réel potentiel clinique, mais nécessite une identification préalable des antigènes de la tumeur[254]. La plupart des antigènes qui ont été identifiés à ce jour sont des auto-antigènes, dont un grand nombre sont soit exprimés de façon ectopique soit surexprimés dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux. Une autre catégorie d'antigènes tumoraux correspond à des antigènes uniques dérivés de gènes mutés et donc exprimés exclusivement dans les tumeurs. Ces différents antigènes tumoraux (surexprimés ou spécifiques) peuvent contenir des épitopes peptidiques reconnus par des LT « naturellement » anti-tumoraux. L'expansion *in vitro* d'un grand nombre de tels LT anti-tumoraux actifs *in vivo* n'est possible que grâce à la reconnaissance par ces LT des peptides tumoraux dont ils sont spécifiques. Le principal défi d'une ICA basée sur l'injection de tels LT est d'induire une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales qui expriment ces peptides tumoraux.

Bien que la reconnaissance des antigènes tumoraux soit nécessaire pour induire une réponse immunitaire, elle n'est pas suffisante pour permettre l'éradication de la tumeur. Pour être efficace, une expansion des LT anti-tumoraux en nombre suffisant, puis leur migration vers les sites tumoraux afin d'exercer leurs fonctions est nécessaire. Les lymphocytes « naturellement » anti-tumoraux utilisés pour l'ICA peuvent être obtenus soit à partir du sang périphérique[255] soit à partir du stroma des tumeurs réséquées (*TILs* : *Tumor Infiltrating Lymphocytes*)[256]. Des lymphocytes du sang périphérique peuvent aussi être génétiquement modifiés pour exprimer des *TCRs* ou des *CARs* (*Chimeric Antigen Receptors*) anti-tumoraux. L'ICA présente plusieurs avantages par rapport à d'autres formes d'immunothérapie décrites ci-dessus. En effet, un grand nombre de cellules (jusqu'à 10^{11} cellules) avec une activité anti-tumorale peuvent être obtenues *in vitro* et les cellules qui présentent une forte reconnaissance des antigènes tumoraux peuvent être sélectionnées avant injection[257]. De plus, avant le transfert des cellules chez l'hôte, le microenvironnement peut être modifié, notamment par la suppression de LT régulateurs ou de cellules myéloïdes suppressives pouvant interférer de manière significative avec l'activité anti-tumorale des LT. La possibilité d'éliminer ces cellules suppressives avant l'administration des cellules anti-tumorales effectrices représente une avancée majeure pour une ICA plus efficace.

Dans le mélanome et le carcinome rénal, l'ICA est historiquement basée sur la réinjection de TIL, dont l'expansion est faite *ex vivo* en présence de cytokines telles que l'IL-2 et parfois avec des stimuli d'activation spécifique ou non spécifique[258–260]. Dans la plupart des cas, l'utilisation de TIL est impossible, car les biopsies ou les pièces opératoires permettant l'isolement des TIL sont indisponibles, ou les tumeurs sont faiblement infiltrées. Pour une utilisation élargie à d'autres tumeurs et pour plus d'efficacité clinique, l'ICA repose souvent maintenant sur l'utilisation de lymphocytes du sang périphérique, moins différenciés.

Les LT du sang périphérique peuvent être génétiquement modifiés pour exprimer des TCR avec une forte affinité et une haute spécificité pour les antigènes tumoraux ciblés. Les TCR utilisés actuellement dans les essais cliniques peuvent être d'origine humaine ou murine. Lorsque des TCR possèdent de fortes affinités, ils peuvent être isolés, et les gènes codant ces TCR peuvent être clonés dans des gammarétrovirus ou des lentivirus, qui sont ensuite utilisés pour transduire des LT de patients[261]. Il est également possible d'utiliser des TCR isolés de souris HLA-transgéniques. Dans une étude réalisée en 2011, des LT humains génétiquement modifiés pour exprimer un TCR murin HLA-A2.1 restreint dirigé contre l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) ont été administrés à trois patients atteints de cancer colorectal

métastatique réfractaire aux traitements standards. Ces LT ont permis une régression des métastases chez un des patients. Cependant, une toxicité, se traduisant par une colite inflammatoire transitoire sévère, a été induite chez les trois patients inclus dans l'étude[262]. Pour éviter ce type d'effet indésirable, il faudrait envisager de cibler des antigènes exprimés uniquement par les cellules tumorales. Les antigènes uniques dérivés de gènes mutés dans les tumeurs seraient donc une cible de choix.

Des LT du sang périphérique de haute spécificité peuvent également être obtenus en utilisant un transgène codant un récepteur chimérique spécifique d'un antigène exprimé à la surface des cellules tumorales, appelé *CAR* (*Chimeric Antigen Receptor*)[263]. Un *CAR* reconnaît l'antigène tumoral à travers la région variable d'un anticorps fusionné à des domaines intracellulaires de TCR capables d'activer des LT. Le *CAR* permet aux LT modifiés de reconnaître l'antigène tumoral indépendamment de sa présentation sur les molécules du CMH. Plusieurs essais cliniques ont déjà démontré le potentiel thérapeutique des LT exprimant des *CARs*, chez des patients atteints de tumeurs hématologiques, mais aussi de tumeurs solides[264–269].

Les résultats de plusieurs essais cliniques indiquent que les propriétés intrinsèques liées au stade de différenciation des LT utilisés sont cruciales pour le succès des approches d'ICA[270]. Les LT $CD8^+$ déclenchent le rejet des tumeurs chez l'homme et chez la souris. Ils peuvent être classés en sous-populations mémoires distinctes en fonction de leur différenciation précise. Les LT $CD8^+$ se différencient (à partir de cellules naïves) en cellules T centrales mémoires (T_{CM} ou *Central Memory T cells*) et en cellules T mémoires effectrices (T_{EM} ou *Effector Memory T cells*)[203]. Ces dernières années, il y a eu un intérêt particulier pour une sous-population distincte de LT $CD8^+$ mémoires, appelée T_{SCM} (*Stem Cell-like Memory T cells*). Ces T_{SCM} ont une capacité d'autorenouvellement, ont une forte capacité de prolifération, et peuvent se différencier en T_{CM} et T_{EM} (Figure 13). Ils ont des propriétés anti-tumorales supérieures aux autres sous-populations de cellules T mémoires, ce qui suggère qu'elles seront plus efficaces pour une ICA chez des patients atteints de cancer[117,271].

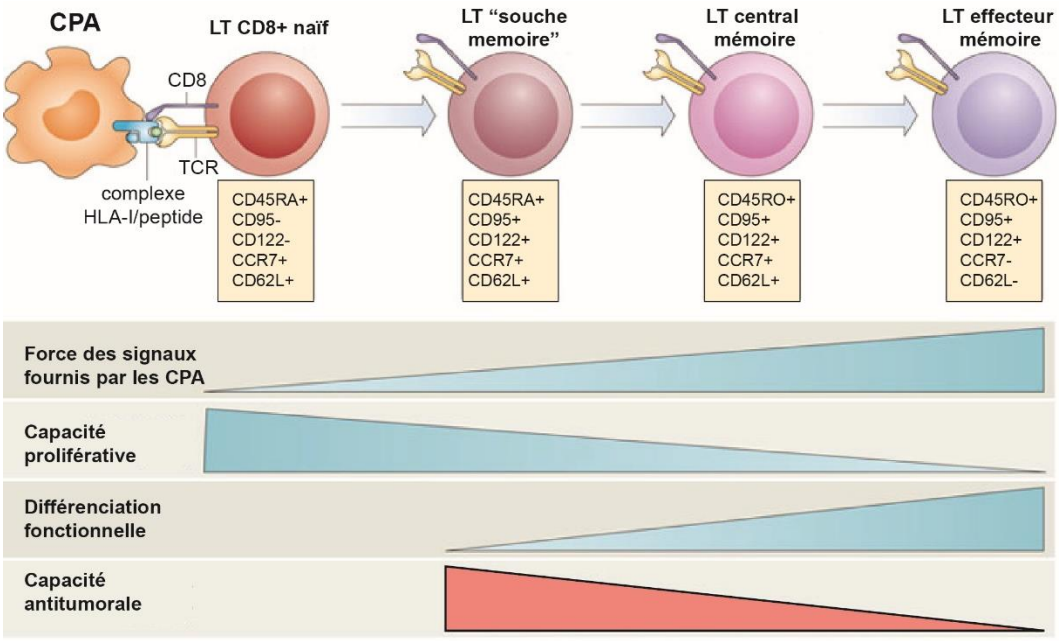


Figure 13 : Capacité anti-tumorale au cours de la différenciation progressive des lymphocytes T

L'activation spécifique des LT naïfs induit des changements progressifs de leur phénotype et de leur fonction. Selon la force et la durée des signaux qu'ils reçoivent pendant leur activation, les LT prolifèrent et s'engagent dans des voies de différenciation diverses, le processus de différenciation des LT aboutissant à la perte de la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération. Le transfert adoptif des LT à des stades précoces de différenciation permet une meilleure activité anti-tumorale et les LT souches mémoires pourraient être les plus efficaces dans les protocoles d'immunothérapie adoptive, puisqu'ils peuvent se différencier et donner naissance aux LT centraux mémoires et aux LT effecteurs mémoires, qui ont une forte capacité à lyser les cellules tumorales. CCR7, *C-Chemokine Receptor type 7* ; CPA, cellule présentatrice d'antigène ; HLA, *Human leucocyte antigen* ; TCR, *T cell receptor*. D'après Restifo, N. P. *et al*. Nat. Rev. Immunol. 12, 269–281 (2012)

Les LT susceptibles d'être utilisés pour une ICA efficace doivent répondre à un certain nombre de critères, appelés « FRESH » (*Function, Remanence, Expansion, Survival, Homing*) par Sadelain et collaborateurs[263]. De façon importante, la spécificité antigénique et l'activité cytotoxique des LT doivent être préservées tout au long de l'expansion (*Function*). Cela peut exiger la présentation d'antigènes optimisée et/ou la purification des LT. De plus, les LT générés doivent avoir une mémoire immunologique de longue durée (*Remanence*). Par ailleurs, le nombre de ces LT (au moins 10^9 LT par kg) est un paramètre crucial dans les modèles expérimentaux et cliniques de thérapie cellulaire adoptive (*Expansion*). En effet, la génération de quantités suffisantes de LT et l'isolement éventuel de clones de cellules T nécessitent une expansion *ex vivo* satisfaisante. Il faut noter également que le soutien de la

réponse par des cytokines *in vivo* et dans les conditions d'activation des LT au cours de leur expansion *ex vivo* est crucial pour la survie des LT injectés (*Survival*). Enfin pour une ICA efficace, les LT doivent avoir la capacité de migrer vers la tumeur pour exercer leur action anti-tumorale (*Homing*).

2. Stimulation *in vitro* de lymphocytes T « naturellement » anti-tumoraux

A la différence des stratégies utilisant des LT modifiés génétiquement pour leur conférer une spécificité antigénique, une stratégie d'ICA très prometteuse est basée sur l'amplification et la stimulation *in vitro* de LTC du sang périphérique qui seront ensuite réinjectés aux patients. Pour stimuler efficacement de tels LTC, des systèmes artificiels de présentation d'antigène peuvent être utilisés.

IV. Systèmes artificiels de présentation d'antigène

L'activation, l'expansion et la différenciation d'un LT spécifique d'un antigène sont déterminées par l'interaction entre le LT et une CPA. Toute cellule exprimant des molécules HLA est une potentielle CPA. Cependant, toutes les CPA ne sont pas égales dans leur capacité à stimuler des LT. Les CPA « professionnelles », qui comprennent les cellules dendritiques, les cellules B et les macrophages, sont mieux équipées que d'autres types de cellules pour maximiser la stimulation des cellules T.

L'isolement et l'expansion de ces CPA autologues, sont des processus fastidieux représentant un obstacle pour la stimulation et l'expansion *in vitro* de LT lors d'une ICA. Des systèmes de présentation d'antigène artificiels pour l'expansion rapide de LT efficaces ont donc été développés. Ces systèmes de présentation d'antigène artificiels sont conçus pour stimuler l'expansion et l'obtention de LT fonctionnels avant la réinjection lors d'une ICA, sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des CPA autologues. Les systèmes de présentation d'antigènes artificiels sont basés sur des systèmes acellulaires et des systèmes cellulaires. Certains sont spécifiques des antigènes, alors que d'autres sont des "amplificateurs" non spécifiques des lymphocytes.

A. Systèmes acellulaires

Les systèmes acellulaires peuvent être classés en deux grands types : (1) les constructions dérivées de macromolécules naturelles telles que des phospholipides, et (2) les constructions utilisant des produits synthétiques tels que des polymères (biodégradables et non biodégradables) et des billes magnétiques. Parmi ces systèmes, on peut citer : les exosomes, les billes de latex et les billes magnétiques (Figure 14)[272]. Les exosomes sont constitués de phospholipides amphiphiles et de molécules de cholestérol assemblées principalement dans des vésicules sphériques avec un intérieur aqueux. Ce sont des vésicules sécrétées par les endosomes cellulaires qui présentent l'antigène au sein de molécules HLA de classe I ou II, et fournissent l'adhésion et la co-stimulation nécessaires pour l'activation des lymphocytes. Les billes de latex sont recouvertes de molécules CD3 et permettent de stimuler de façon non spécifique des LT par leur TCR. En plus de la stimulation de la voie de signalisation du TCR par le CD3, des signaux de co-stimulation ou d'inhibition peuvent être fournis par des ligands agonistes ou antagonistes et/ou des anticorps liés de manière covalente aux billes[273]. Ces billes peuvent être dotées d'une spécificité antigénique lorsqu'elles sont recouvertes avec un complexe CMH-peptide à chaîne unique. Les billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 sont utilisées pour stimuler de manière non spécifique à la fois des LT $CD4^+$ et des LT $CD8^+$. Elles peuvent stimuler des LT de manière spécifique, lorsqu'elles portent des molécules HLA ou des protéines de fusion HLA-Ig (molécules HLA couplées avec des immunoglobulines), chargées avec des peptides antigéniques[272].

B. Systèmes cellulaires

Les systèmes cellulaires sont dérivés de cellules humaines, ou encore de cellules xénogéniques. Ils sont principalement générés en utilisant la transduction gammarétrovirale ou lentivirale pour introduire des molécules nécessaires à la formation de la synapse immunologique (CMH, molécules d'adhésion et de costimulation). Trois types de cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) ont été développés jusqu'à présent. Ces systèmes ont été dérivés de lignée de cellules humaines dérivée de leucémie, de lignée de cellules d'insecte, et de lignée de fibroblastes de souris[274].

1. CPAA dérivées de cellules d'insectes

L'un des premiers systèmes de CPAA utilisait des cellules de drosophile (*Drosophilia melanogaster*) qui avaient été transduites pour exprimer de manière stable des molécules du CMH murin ou humain, et des molécules co-stimulatrices. Les cellules de drosophile ne peuvent pas charger des peptides endogènes sur les molécules du CMH-I. Les peptides tumoraux sont donc chargés de façon exogène. Ces CPAA ont été utilisées pour induire la prolifération de LT murins et humains. L'incapacité des cellules de drosophile à présenter des antigènes endogènes protège contre l'induction de la xénoréactivité. Le système de CPAA dérivé de cellules de drosophile a été utilisé pour amplifier des LT anti-tumoraux dans une étude clinique de thérapie adoptive par transfert de LT chez des patients atteints de mélanome[275]. Cependant, il existe des inconvénients significatifs de ces CPAA dérivées de cellules de drosophile, en particulier leur incapacité à survivre en culture à 37°C (les cellules de drosophile poussent à 30°C) et à stimuler la prolifération de LT $CD8^+$ en l'absence de cellules mononucléées du sang périphérique[273,274].

2. CPAA dérivées de cellules K562

La lignée cellulaire dérivée d'une leucémie humaine K562 a été utilisée par June et collaborateurs afin de générer des CPAA, pour l'activation et l'expansion de LT humains à la fois non spécifiques et spécifiques (Figure 14)[274]. Les cellules K562 n'expriment pas de façon endogène les molécules HLA-A, B ou DR mais expriment des molécules HLA-C[274]. Ces cellules peuvent être revêtues d'anticorps murins (IgG) anti-CD3 et anti-CD28 humains après transduction avec un récepteur spécifique de la fraction constante des IgG de souris, CD32, leur permettant d'induire une prolifération non spécifique des LT. La prolifération des LT induite par les CPAA K562 est robuste en dépit de leur expression de molécules régulatrices négatives telles que PD-L1, PD-L2 et B7-H3. Les cellules K562 ont également été transduites avec une variété de molécules co-stimulatrices pour augmenter encore la signalisation, telles que CD40, CD40L, CD70, CD80, CD83, CD86, ICOSL, GIRL, 4-1BBL et OX40L. Chacune de ces molécules contribue ainsi à la prolifération des LT *ex vivo*[273,274].

3. CPAA dérivées de fibroblastes murins

Cette stratégie est basée sur l'utilisation de fibroblastes murins NIH/3T3. Les fibroblastes murins NIH/3T3 ont été d'abord utilisés pour tester les fonctions des molécules accessoires impliquées dans l'activation des LTC chez la souris et chez l'homme[274]. Ainsi, il a

été montré que B7.1 et ICAM-1 étaient deux molécules importantes pour activer des LTC murins[276]. Latouche et collaborateurs ont ensuite testé la capacité de ces fibroblastes murins à stimuler et amplifier des LTC humains (spécifiques d'un antigène viral ou tumoral) dérivés du sang périphérique en vue d'une ICA[277]. Les fibroblastes murins NIH/3T3 ont été transduits par cinq vecteurs gammarétroviraux de manière à exprimer la β2-microglobuline, la chaîne lourde HLA-A*0201, ainsi qu'une combinaison de trois molécules accessoires (B7.1, ICAM-1 et LFA-3). Ces cellules ont ensuite été transduites avec différents antigènes tumoraux ou viraux sous forme de peptides ou de protéines entières. Ces CPAA sont capables de stimuler efficacement des LT périphériques humains spécifiques d'un antigène viral ou tumoral[277].

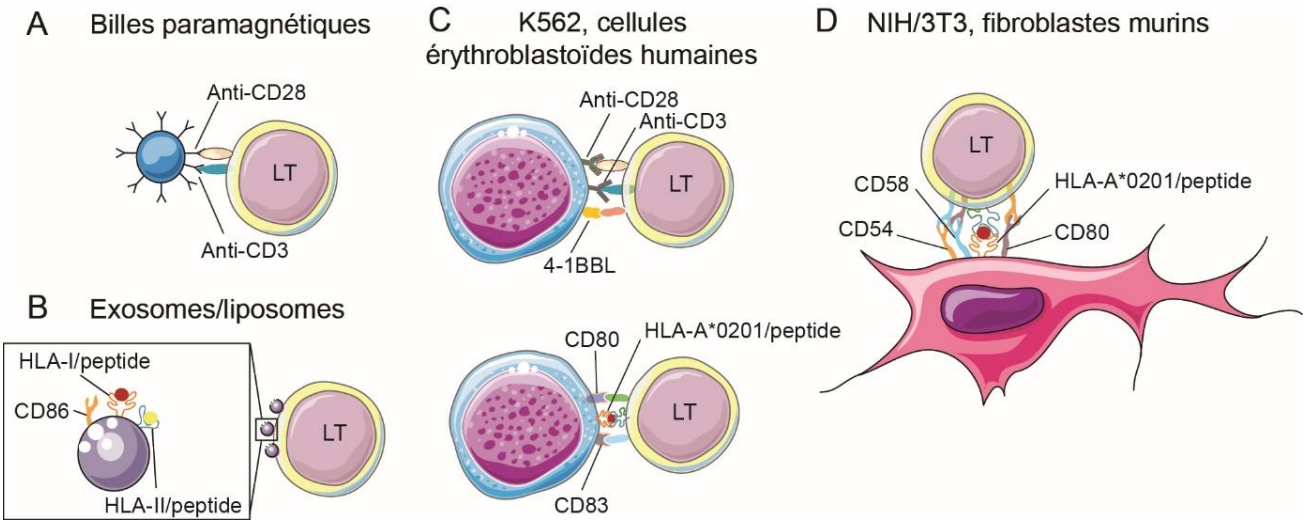


Figure 14 : Exemples de systèmes de présentation d'antigène artificiels

(A et B) Systèmes acellulaires. (C et D) Systèmes cellulaires.

(A) Billes paramagnétiques présentant des immunoglobulines anti-CD3 et anti-CD28 humain.

(B) Exosomes/liposomes présentant des molécules HLA de classe I et II, et la molécule de costimulation CD86.

(C) Système allogénique d'amplification de lymphocytes T. En haut : pour une amplification non spécifique des LT, des immunoglobulines anti-CD3 et anti-CD28 humains peuvent être fixées sur les cellules humaines K562 après transduction avec CD32 murin (K32). En bas : pour une amplification spécifique des LT, les K562 ont été transduites pour exprimer des molécules HLA, ainsi que différentes molécules de costimulation dont CD80 et CD83.

(D) Système xénogénique de présentation d'antigène. Des cellules dérivées de fibroblastes murins NIH/3T3 expriment un complexe HLA-peptide et les molécules accessoires CD54, CD58 et CD80. D'après Kim, J. V. *et al*. Nat. Biotechnol. 22, 403–410 (2004) et Butler, M. O. *et al*. Clin. Cancer Res. 13, 1857–1867 (2007)

Partie III : Les antigènes tumoraux

I. Les différentes catégories d'antigènes tumoraux

Un antigène est une molécule, habituellement une protéine ou un polysaccharide, qui peut stimuler une réponse immunitaire. En fonction de leurs profils d'expression dans les tissus normaux et tumoraux, les antigènes tumoraux peuvent être divisés en 2 groupes : les antigènes partagés (exprimés à la fois par les cellules normales et tumorales) et les antigènes codés par des gènes mutés ou viraux (exprimés exclusivement dans les cellules cancéreuses).

A. Les antigènes partagés

1. Antigènes de différenciation

L'expression des antigènes de différenciation est restreinte aux tumeurs et aux tissus normaux dont ils dérivent (Figure 15). La plupart de ces antigènes ont été décrits dans le mélanome et les mélanocytes normaux[278]. Le premier antigène de ce groupe à avoir été décrit dans le mélanome est Melan-A, aussi appelé MART-1 (*Melanoma Antigen Recognized By T cells-1*)[279,280]. C'est une protéine de 118 acides aminés. Les peptides immunodominants HLA-A0201 restreints, Melan-A_{27-35} (AAGIGILTV) et Melan-A_{26-35} (EAAGIGILTV), sont dérivés de cette protéine MART-1[281,282]. Des études de liaison aux molécules du CMH réalisées avec ces deux peptides ont permis d'identifier un peptide modifié nommé Melan-A/MART-1_{26-35}A27L (ELAGIGILTV) plus affin pour la molécule HLA-A*0201, ayant une meilleure immunogénicité par rapport aux deux peptides natifs précédents[283]. D'autres antigènes de différenciation ont également été trouvés dans des tumeurs épithéliales, comme le PSA (*Prostate Specific Antigen*) dans les cancers de la prostate, la mammaglobine A dans les cancers du sein, ou l'ACE dans les cancers colorectaux[284–286], fournissant ainsi de nouvelles cibles pour l'immunothérapie dirigée spécifiquement contre ces tumeurs solides. Toutefois, étant donné que l'expression de ces antigènes ne se limite pas au tissu tumoral, leur utilisation comme cibles pour une immunothérapie peut conduire à une auto-immunité envers le tissu normal correspondant. Ce groupe d'antigènes est néanmoins utilisé couramment dans des essais cliniques contre le cancer.

2. Antigène surexprimés

Les antigènes surexprimés sont exprimés à un faible niveau dans une grande variété de tissus normaux et sont surexprimés dans les tumeurs (Figure 15). Il est possible que la plupart des épitopes éventuellement présentés par les tissus normaux soient en-dessous du seuil nécessaire pour leur reconnaissance par des LTC, tandis que leur surexpression dans les cellules tumorales peut déclencher une réponse anti-tumorale par rupture de la tolérance précédemment établie. Parmi les antigènes de ce groupe, on peut citer par exemple Her2/Neu (*Human epidermal receptor 2/Neurological*)[287] et hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*)[288].

3. Antigènes CT (*Cancer Testis*) ou « antigènes germinaux »

Les antigènes testiculaires ou antigènes CT (*Cancer Testis*) sont exprimés dans les tissus tumoraux, mais pas dans les tissus sains, à l'exception des cellules germinales testiculaires et le placenta (Figure 15). Ils résultent de la réactivation dans la tumeur de gènes normalement inactifs ou silencieux dans les tissus adultes[289], suite à une déméthylation de leur promoteur[290]. Les cellules germinales testiculaires et les cellules placentaires étant dépourvues de molécules du CMH-I ou du CMH-II, elles ne peuvent donc être la cible d'une réaction auto-immune par les LT. Ces antigènes sont ainsi considérés comme spécifiques de tumeur et présentent donc un potentiel intérêt pour une immunothérapie. L'antigène MAGE-1 (*Melanoma-Associated Antigen-1*) a été le premier antigène CT décrit[291]. D'autres antigènes de cette catégorie ont ensuite été décrits comme par exemple d'autres membres de la famille MAGE[292] ou encore l'antigène NY-ESO-1 (*New York-Esophageous-1*)[293].

B. Les antigènes codés par des gènes viraux ou mutés

1. Antigènes viraux

Les antigènes viraux résultent d'infections virales associées aux cancers. Les cancers d'origine virale expriment des protéines dérivées de virus pouvant être reconnues par le système immunitaire (Figure 15). Dans le cancer du col de l'utérus, ou les cancers ano-génitaux en général, on peut citer l'exemple des oncoprotéines E6 et E7 issues du virus HPV (*Human Papilloma Virus*)[294–296]. Les peptides dérivés de l'oncoprotéine E7 peuvent être

présentés par les molécules HLA-A2 à des LTC. On peut également citer l'exemple des infections dues à l'EBV (*Epstein-Barr Virus*) associées à certains lymphomes[297,298].

2. Antigènes codés par des gènes mutés ou néoantigènes

Les néoantigènes proviennent généralement de mutations ponctuelles[299], de mutations décalant le cadre de lecture[300] ou de translocations chromosomiques produisant des protéines de fusion[301]. Ces antigènes sont hautement spécifiques des cellules tumorales portant les altérations géniques dont ils dérivent.

Un grand nombre de LTC isolés à partir du sang ou de tumeurs de patients atteints de cancer sont capables de reconnaître des antigènes qui résultent de mutations ponctuelles de gènes exprimés de manière ubiquitaire[302–305]. Dans la plupart de ces cas, la mutation change un acide aminé dans la séquence peptidique, ce qui permet à un peptide muté de se lier à une molécule du CMH de classe I et de créer un nouveau déterminant antigénique qui est reconnu par des LTC (Figure 15).

Les mutations provoquant un décalage du cadre de lecture, peuvent également conduire à la production de nouveaux peptides antigéniques[306,307]. Par exemple, dans les cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire, la perte de fonction du système MMR (*DNA Mismatch Repair system*) peut conduire à des insertions ou délétions au niveau de courtes séquences répétées codantes de l'ADN, engendrant un décalage du cadre de lecture et la génération de nouvelles protéines[300]. Le premier néoantigène de ce type à avoir été décrit comme immunogène est issu de la mutation (-1) du gène codant le récepteur du TGF-β de type II (TGFβRII (-1)). Cette mutation se produit dans une séquence polyA (10 résidus Adénine) de l'exon 3 du gène *TGFβRII*[307].

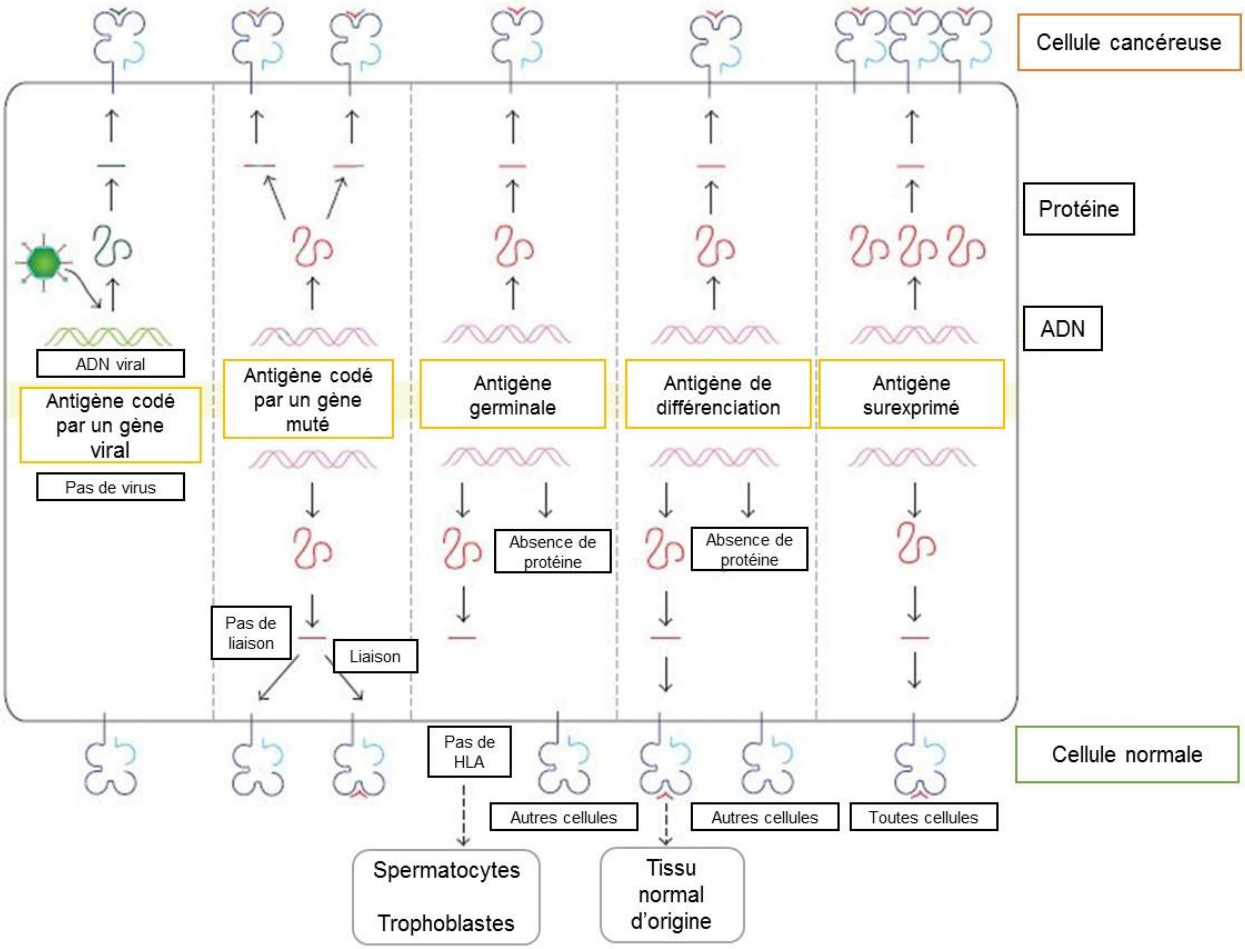


Figure 15 : Les antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques

Les antigènes tumoraux sont classés selon le profil d'expression du gène dont ils dérivent. La production de peptides antigéniques par les cellules tumorales (panneau supérieur) et par les cellules normales (panneau inférieur) est représentée. Les antigènes viraux sont exprimés uniquement dans des cellules infectées par un virus (première colonne à gauche). Les antigènes dérivés de gènes mutés peuvent générer un peptide modifié capable de se lier aux molécules HLA de classe I tandis que le peptide de type sauvage ne peut pas se lier (deuxième colonne à gauche). La mutation peut également modifier un peptide capable de se lier aux molécules HLA de classe I, de sorte que ce peptide modifié soit reconnu comme du non-soi par les lymphocytes T cytotoxiques circulants. Les antigènes tumoraux dérivés de gènes de la lignée germinale sont exprimés dans les tumeurs ou les cellules de la lignée germinale à la suite d'une déméthylation du génome (colonne du milieu). Par exemple, les antigènes de la famille MAGE (*Melanoma-Associated Antigen*) ne sont pas exprimés à la surface des cellules saines ni sur les cellules de la lignée germinale qui n'expriment pas de molécules HLA. Les antigènes de différenciation sont codés par des gènes ayant une expression tissu-spécifique (deuxième colonne à droite). Ils sont donc exprimés par certains types de tumeurs et les tissus sains correspondants. Certains gènes sont surexprimés dans des tumeurs en raison de l'augmentation de la transcription ou de l'amplification de ces gènes. Les peptides résultants sont fortement exprimés par les tumeurs, mais présentent également un faible niveau d'expression dans des tissus sains. D'après Nathalie Vigneron. BioMed Res Int, 948501 (2015)

II. Méthodes d'identification des antigènes et des épitopes tumoraux

Les cellules tumorales diffèrent des cellules normales par l'expression d'antigènes spécifiques de la tumeur ou d'antigènes associés à la tumeur. Ces antigènes sont reconnus par le système immunitaire du patient et peuvent être la cible de réponses immunitaires humorales et cellulaires. La plupart de ces antigènes sont exprimés dans le cytosol ou dans des organelles des cellules, et ne sont donc pas principalement ciblés par des anticorps. Ces protéines antigéniques sont donc dégradées et présentées *via* les molécules du CMH-I ou du CMH-II sous forme de peptides à la surface des cellules tumorales et des CPA, aux LT CD8 et aux LT CD4. Si le peptide lié à une molécule HLA à la surface d'une cellule tumorale est reconnu spécifiquement par le TCR d'un LTC activé, une cascade de signaux apoptotiques ainsi que la sécrétion de diverses cytokines seront initiées, conduisant à la mort de cette cellule tumorale. De tels antigènes tumoraux représentent donc des cibles potentielles pour le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie. En effet, la sélection des antigènes tumoraux les plus immunogènes, impliqués dans la carcinogénèse, spécifiques de la tumeur, exprimés à un haut niveau par les cellules tumorales et partagés par de nombreux patients est un critère très important pour le développement de meilleures stratégies d'immunothérapie[308]. Il existe différentes approches pour identifier ces antigènes cibles d'intérêt thérapeutique, certaines de ces approches pouvant être complémentaires. Les quatre grandes approches expérimentales d'identification des antigènes et des épitopes tumoraux communément utilisées sont : (1) l'approche « génétique », (2) l'approche sérologique, (3) l'approche de l'« immunologie inverse » et (4) l'approche « directe » ou « cellulaire ».

A. Approche génétique

L'approche génétique, développée par Thierry Boon[291] et ses collègues, a conduit à l'identification des premiers antigènes tumoraux et de leurs épitopes peptidiques. L'antigène MAGE-1 a été le premier antigène tumoral à avoir été identifié avec cette approche[291]. L'identification du premier épitope spécifique de tumeur dérivé de l'antigène MAGE-1 et reconnu par des LTC a ensuite été réalisée[309]. Cette approche est basée sur l'utilisation de cellules transfectées avec des banques d'ADNc préparées à partir de lignées de cellules tumorales. Les cellules transfectées sont ensuite testées pour leur reconnaissance par des clones de LTC autologues spécifiques de tumeurs. Cette approche nécessite la génération de lignées cellulaires tumorales et l'utilisation de clones lymphocytaires T. Ces clones sont dérivés de culture *in vitro* de cellules tumorales autologues avec des TIL ou des LT du sang

périphérique. Bien que la génération de lignées cellulaires tumorales n'est pas toujours réalisable en fonction de la tumeur, cette stratégie a tout de même conduit à l'identification de plusieurs antigènes tumoraux et plus particulièrement à l'identification d'antigènes dans le mélanome tels que ceux des familles MAGE, BAGE et GAGE[292,310], Melan-A/MART-1[279,280], tyrosinase[311] et gp100[312].

Les technologies *microarray* avec de l'ADNc[313,314] ont été également utilisées pour l'identification d'antigènes tumoraux. Elles sont basées sur l'utilisation de puces ARN ou ADN permettant l'analyse comparative des profils d'expression des gènes du tissu tumoral et du tissu sain autologue. Cette approche peut permettre, par exemple, l'identification de gènes surexprimés ou exprimés exclusivement dans la tumeur. Ces technologies peuvent être combinées avec la spectrométrie de masse pour permettre l'identification des ligands de molécules du CMH. Une combinaison de ces deux outils analytiques a permis par exemple la caractérisation de 77 ligands du CMH, dont 10 dérivaient de produits de gènes surexprimés, dans un carcinome rénal[315]. Ces technologies peuvent également être combinées à d'autres approches telles que l'« immunologie inverse » pour l'identification d'antigènes et d'épitopes tumoraux.

Avec l'avènement des technologies de séquençage à haut débit du génome humain qui permettent l'identification systématique de mutations dans les cellules cancéreuses, on a assisté à une révolution des méthodes génomiques d'identification des antigènes tumoraux. Toutes les mutations détectées par ces technologies pourraient conduire, si elles sont traduites, à l'expression de protéines mutées dont les peptides dérivés pourraient être présentés sur les molécules du CMH. Dans un modèle de sarcome murin, le NGS (*Next Generation Sequencing*) a été utilisé pour déterminer les mutations spécifiques des cellules tumorales dans la tumeur naissante. Ceci a permis d'évaluer l'immunogénicité des antigènes mutés. En effet, ces antigènes sont cruciaux pour l'*immunoediting*, car leur perte d'expression pourrait conduire à la croissance des tumeurs[316]. Dans un modèle murin de mélanome, la comparaison des cellules saines et des cellules tumorales a révélé de nombreuses mutations ponctuelles. Ces mutations peuvent conduire à une expression aberrante de peptides potentiellement spécifiques de la tumeur. Ces peptides ayant été prédits de façon bioinformatique, ils doivent être validés comme étant des épitopes immunogènes à l'aide de tests fonctionnels. Il faut noter que seulement un tiers des peptides mutés identifiés par NGS ont pu être validés comme étant des épitopes immunogènes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le séquençage seul

du génome est insuffisant pour déterminer si des séquences mutées sont traduites et, si elles sont traduites, si elles sont potentiellement immunogènes.

B. Approches sérologiques : méthodes de détection d'antigènes tumoraux basées sur l'utilisation d'anticorps

La recherche d'anticorps permettant de distinguer les cellules cancéreuses des cellules normales est très importante dans le domaine de la recherche sur le cancer. L'immunisation des animaux de laboratoire avec des cellules tumorales humaines et l'élimination des anticorps réagissant avec des antigènes de tissus normaux représentent la première approche sérologique pour la reconnaissance des antigènes tumoraux. En utilisant cette approche, deux antigènes tumoraux humains ont été identifiés : l'alpha-foetoprotéine (AFP), un marqueur du sérum pour le carcinome hépatique[317], et l'antigène carcino-embryonnaire (ACE)[318], un marqueur pour des cancers du colon et d'autres cancers épithéliaux.

Une autre approche sérologique pour l'identification des antigènes tumoraux a été développée dans les années 1970 par le groupe de Lloyd Old [319–321]. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de sérum autologue de patients atteints de cancers et de lignées cellulaires autologues. La mise en évidence que les sérums de patients atteints de certaines tumeurs étaient capables de reconnaître spécifiquement des structures exprimées sur les cellules tumorales autologues, mais pas sur les cellules normales, a confirmé l'existence d'antigènes spécifiques de tumeurs et la spécificité des réponses anticorps chez des patients cancéreux[322]. Dans les années 1980, la sérologie des tumeurs a été dominée par la caractérisation d'antigènes tumoraux humains en utilisant des anticorps monoclonaux murins[323]. Certains antigènes identifiés par des anticorps monoclonaux se sont révélés être des marqueurs spécifiques de tumeurs[324], tels que le CA 19-9 dans le cancer du pancréas humain[325], le CA-125 pour le cancer de l'ovaire[326] et les *MGAgs* pour les cancers gastriques[327]. Les différents antigènes identifiés grâce à des anticorps ont un rôle dans le diagnostic et le suivi de certains types de cancers humains. Toutefois, la seule reconnaissance des molécules associées à des tumeurs par le système immunitaire murin, ne permet pas de valider l'immunogénicité des antigènes tumoraux chez l'homme.

Toujours basée sur la réponse humorale, une autre stratégie, développée par Pfreundschuh et collaborateurs, nommée SEREX (*Serological identification of antigens by recombinant Expression cloning*), utilise le répertoire d'anticorps de patients atteints de

cancers pour l'identification des antigènes tumoraux[328]. Cette approche ne nécessite pas l'utilisation de lignées cellulaires tumorales et de clones de LTC. Des échantillons de tumeurs fraîches sont utilisés pour la construction de banques d'expression d'ADNc permettant ainsi de limiter l'analyse aux gènes qui sont exprimés par les cellules tumorales *in vivo*. Par conséquent, les artefacts qui sont associés à la culture *in vitro* des lignées de cellules tumorales à court et à long terme sont évités. Cette approche permet d'identifier à la fois des antigènes natifs mais également des épitopes restreints aux molécules du CMH par la stratégie d'immunologie inverse. L'antigène NY-ESO-1[293] est un exemple du large éventail d'antigènes tumoraux qui ont été identifiés par l'approche SEREX. Plus récemment, une analyse SEREX réalisée sur des tumeurs primaires de colon à différents stades a permis la caractérisation de 22 nouveaux antigènes[329].

C. Méthode de l'« immunologie inverse » : basée sur les prédictions bioinformatiques

L'immunologie inverse a commencé avec la mise en évidence du fait que la liaison d'un peptide à une molécule du CMH-I donnée dépend de certains acides aminés principaux appelés « résidus d'ancrage à la poche »[127]. La stratégie d'« immunologie inverse » est basée sur l'utilisation d'algorithmes informatiques de prédiction. Ces algorithmes permettent de prédire les peptides dérivés d'antigènes tumoraux pouvant représenter des cibles intéressantes pour une immunothérapie. Trois grandes étapes contribuent à la présentation de peptides tumoraux sur une molécule HLA de classe I : le clivage de l'antigène par le protéasome, le transport par la machinerie TAP, et la liaison aux molécules du CMH dans le RE. Des programmes de prédiction accessibles sur internet (Tableau 3)[330] ont donc été établis, prenant en compte ces trois étapes afin de permettre l'identification d'épitopes tumoraux HLA restreints. Les deux principaux algorithmes les plus couramment utilisés sont BIMAS et SYFPEITHI. L'algorithme BIMAS[331] (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) a été le premier algorithme sur le *net*, ses prédictions étant basées sur des études de liaison utilisant des peptides synthétiques. L'algorithme SYFPEITHI[138,332,333] (http://www.syfpeithi.de/) a ensuite été disponible, et ses prédictions sont basées sur le rôle spécifique des motifs d'ancrage et la position de chaque acide aminé dans le peptide. L'algorithme attribue une valeur positive ou négative à chacun des acides aminés, en fonction des caractéristiques de la poche de la molécule HLA avec laquelle le peptide est supposé interagir. Enfin, d'autres programmes pour la prédiction de la liaison au CMH sont également maintenant disponibles

tels que PREDEP et NetMHC, en plus des programmes qui permettent de prédire le clivage par le protéasome tels que PAPROC[334] (www.paproc.de), NetChop[335] (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/) ou FragPredict[336] (www.mpiibberlin mpg.de/MAPPP/). Il existe également des programmes de prédiction pour les épitopes tumoraux restreints au CMH-II tels que TEPITOPE[337] dont les matrices sont construites sur la base de l'interaction de chaque acide aminé avec la poche du CMH-II. Après la prédiction *in silico*, les peptides doivent être validés comme étant des épitopes reconnus par des LT. Cette validation est réalisée le plus souvent par l'induction *in vitro* de LT spécifiques du peptide prédit. La confirmation de la présentation du peptide prédit par les molécules du CMH exprimées par les cellules cancéreuses est obtenue généralement en utilisant des clones de LT spécifiques du peptide pour lyser des cellules tumorales primaires.

Programme	PRO	TAP	CMH	Adresse du site internet
BIMAS			+	www-bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind
HLA ligand			+	http://hlaligand.ouhsc.edu
MAPPP	+		+	www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP
MHC-pathway	+	+	+	www.mhc-pathway.net
MHCPred			+	www.jenner.ac.uk/MHCPred
NetChop	+			www.cbs.dtu.dk/services/NetChop
NetMHC			+	www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC
PAPROC	+			www.paproc.de
PREDEP			+	http://bioinfo.md.huji.ac.il/marg/Teppred/mhc-bind
ProPred-I	+		+	www.imtech.res.in/raghava/propred1/index.html
RANKPEP	+		+	www.mifoundation.org/Tools/rankpep.html
SVMHC			+	www.sbc.su.se/svmhc/new.cgi
SYFPEITHI			+	www.syfpeithi.de

Tableau 3 : Algorithmes de prédiction d'antigène

PRO, basé sur la prédiction de clivage de l'antigène par le protéasome ; TAP, basé sur la prédiction de transport par la machinerie TAP ; CMH, basé sur la prédiction de liaison à la molécule du CMH. D'après Stefan Stevanovic. Transpl Immunol. 14, (3-4):171-4 (2005)

D. Approches « directes » ou « cellulaires » : méthodes directes d'analyse et d'identification d'épitopes CMH-I restreints

De nombreuses stratégies d'analyse qualitative et quantitative à grande échelle de ligands du CMH-I ont été décrites au cours des 30 dernières années.

1. Méthodes d'analyses qualitatives

a. Méthodes d'identification d'épitopes CMH-I restreints basées sur l'utilisation de molécules du CMH solubles

L'approche d'identification des épitopes CMH-I restreints basée sur l'utilisation de molécules du CMH solubles permet l'analyse à grande échelle de ligands du CMH[338,339]. Elle est basée sur la transfection de cellules avec des molécules du CMH dépourvues de leur domaine transmembranaire. Les complexes CMH-peptide sont ainsi sécrétés dans le milieu de culture et peuvent facilement être purifiés par immunoprécipitation. Malgré le fait que la quantité de ligands obtenus peut être de l'ordre du milligramme, il faut garder à l'esprit que l'utilisation de technologies recombinantes pourrait changer la qualité des ligands du CMH purifiés. De plus, ces ligands sont présentés en grandes quantités par les molécules du CMH dans des conditions non physiologiques, faussant ainsi profondément le spectre des ligands du CMH (ligandome). Cette approche n'est pas applicable pour l'analyse des ligands de molécules HLA à partir d'échantillons de tissus ou de lignées cellulaires primaires.

b. Elution des peptides CMH restreints exprimés à la surface de cellules viables par un acide faible

La méthode d'élution des peptide CMH restreints avec un acide faible a été décrite la première fois en 1993[340]. Cette approche est basée sur l'isolement des peptides présentés par le CMH-I, exprimés à la surface de cellules viables, grâce à un court (15 à 300 secondes) traitement acide à un pH de 3,3 avec un tampon citrate-phosphate. Les peptides élués sont ensuite séparés par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) et analysés par spectrométrie de masse. Cette approche d'isolement peut être appliquée aussi bien à des cellules adhérentes qu'à des cellules en suspension, et nécessite un nombre minimum de 10^9 cellules pour l'identification. Le protocole de cette approche reste à établir pour l'identification d'épitopes HLA restreints à partir de tumeur solide. Cette méthode a été utilisée, par exemple, pour identifier des épitopes de LT à partir de deux lignées cellulaires de

mélanome (Mel 9792 et Mel 624)[341]. Un peptide immunogène dérivé de la protéine de fusion BCR-ABL a également été identifiée grâce à cette approche[301].

c. Purification par chromatographie d'affinité des complexes CMH-peptide

La méthode de purification par chromatographie d'affinité des complexes CMH-peptide a déjà été décrite à la fin des années 1970[342]. Elle est basée sur la solubilisation des complexes CMH-peptide et leur isolement spécifique par des anticorps monoclonaux immobilisés sur une résine. La plupart des peptides CMH restreints connus ont été isolés par cette méthode ou des adaptations de celle-ci. Une liste complète des peptides avec leurs allèles HLA associés peut être trouvée dans la base de données SYFPEITHI (www.syfpeithi.de).

Dans cette approche, les complexes CMH-peptide sont tout d'abord isolés à partir de tissus congelés, de cellules sanguines, de lignées cellulaires ou de biopsie tumorale[343–345]. Pour obtenir de bonnes quantités de peptides détectables et capables d'être séquencés efficacement, il faut environ 10^9 à 10^{11} cellules[344,346]. Les cellules sont traitées avec un tampon de lyse contenant des détergents non dénaturants, zwitterioniques comme le CHAPS ou non ioniques comme le NP-40. Ces détergents sont généralement utilisés entre 0,5 et 2% pour une bonne solubilisation des complexes CMH. Une fois solubilisées, les molécules du CMH sont spécifiquement isolées en utilisant une colonne d'affinité. La résine présente dans la colonne est préalablement couplée à un anticorps monoclonal. L'anticorps peut être spécifique d'une molécule du CMH donnée (par exemple un anticorps anti-HLA-A2) ou de plusieurs types de molécules du CMH (par exemple un anticorps anti-HLA-A, B et C). Les deux anticorps monoclonaux les plus fréquemment utilisés sont l'anticorps anti-HLA de classe I W6/32[342,347,348] , reconnaissant les molécules HLA-A, B et C, et l'anticorps anti-HLA de classe II L243[348–350], reconnaissant les molécules HLA-DR. Les anticorps sont immobilisés sur des billes de sépharose, soit par des liaisons chimiques covalentes soit par des interactions non covalentes spécifiques avec la fraction constante des anticorps. Les ligands sont ensuite élués avec un acide fort, généralement de l'acide trifluoroacétique, à un pH de 3.0, ce qui provoque la rupture de toutes les liaisons non covalentes. En plus des peptides HLA-restreints, l'éluat contient aussi des constituants des molécules HLA (chaîne lourde α et β2-microglobuline du CMH-I ou chaînes α et β du CMH-II) et l'anticorps (s'il a été immobilisé de manière non covalente). Les peptides CMH-restreints sont séparés des autres protéines par

ultrafiltration en fonction de leur taille. Enfin, l'analyse et le séquençage du *pool* de peptides CMH-restreints est la dernière étape réalisée. La purification est le plus souvent effectuée par chromatographie liquide, les peptides étant séparés en fonction de leur caractère hydrophile ou hydrophobe. Une fois les peptides fractionnés, ils sont séquencés. Jusqu'à présent, le séquençage des ligands du CMH a été principalement réalisé par deux méthodes, à savoir la dégradation d'Edman[351] et la spectrométrie de masse. Au début des années 1990, les peptides CMH-restreints ont souvent été séquencés par dégradation d'Edman automatisée[352]. Cette technique est basée sur la dégradation chimique d'un peptide à partir de l'extrémité N-terminale par le phénylisothiocyanate et l'identification par HPLC des acides aminés clivés. La sensibilité de la méthode est de l'ordre du picomolaire, de sorte que seuls les peptides en grande abondance peuvent être identifiés. Si plusieurs peptides sont mélangés, ce qui est fréquemment observé dans les fractions peptidiques, l'interprétation des données est très difficile, voire impossible, en raison d'un chevauchement des acides aminés dégradés. La spectrométrie de masse pour la caractérisation de peptides CMH-I[353]- et CMH-II[354]-restreints a été utilisée pour la première fois en 1992. L'utilisation de la spectrométrie de masse a été une grande avancée technique dans l'identification à haut débit de ligands du CMH[353]. La spectrométrie de masse peut aujourd'hui être considérée comme le « gold standard » pour l'analyse de peptides HLA-restreints.

La méthode de purification par chromatographie d'affinité des complexes CMH-peptide a été cruciale pour l'identification des motifs d'ancrage spécifiques des molécules du CMH[332], pour le développement et l'enrichissement de la base de données SYFPEITHI. Elle a été également utilisée pour identifier les épitopes HLA-restreints de plusieurs tumeurs malignes, telles que les carcinomes rénaux[355,356], les glioblastomes[357,358], les cancers du poumon[343], les leucémies myéloïdes aiguës[359], les leucémies lymphoïdes chroniques[360], les myélomes multiples[361], les cholangiocarcinomes[362]**.** Le profil des ligands spécifiques de la tumeur est obtenu suite à une analyse comparative des profils des ligands HLA des cellules tumorales avec ceux des cellules saines des tissus adjacents.

2. Méthodes d'analyses quantitatives

Plusieurs techniques ont été mises en place permettant une quantification absolue ou relative des signaux détectés par spectrométrie de masse. En règle générale, la quantification des peptides par spectrométrie de masse est obtenue par un marquage différentiel des peptides à partir de deux ou plus de deux échantillons. Le marquage peut être effectué à différentes

étapes lors de la purification du ligand et de plusieurs manières différentes. Un exemple classique est l'introduction de *tags* ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tags*) au niveau de résidus Cystéine[363]. Pour la quantification des peptides CMH restreints, les peptides isolés et les peptides contrôles sont respectivement modifiés avec des isotopes ICAT lourds ou légers, puis analysés par spectrométrie de masse. D'autres méthodes de quantification basées sur l'introduction de *tags* isotopiques, tels que MCAT (*Mass-Coded Abundance Tagging*)[364], peuvent également être utilisées. Une méthode alternative au marquage avec des isotopes est le système iTRAQ (*isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*)[365] qui utilise des *tags* d'isobares pour la quantification relative et absolue. Dans ce cas, les peptides provenant de différentes sources ne se distinguent pas par un changement de masse, mais plutôt par des ions rapporteurs spécifiques dans les spectres de fragmentation. D'autres méthodes de quantification telles que la méthode SILAC (*Stable Isotope Labelling in Cell culture*)[366] sont basées sur l'incorporation métabolique d'isotopes stables plutôt que sur une modification chimique.

Partie IV : Immunothérapie dans les cancers colorectaux

I. Les cancers colorectaux

Avec environ 1.4 nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde, le cancer colorectal (CCR) représente le deuxième cancer le plus fréquent chez les femmes et le troisième le plus fréquent chez les hommes[367]. En France, avec plus de 42 000 nouveaux cas estimés en 2012, le CCR est le cancer le plus fréquent tous sexes confondus. Ces dernières années, malgré la baisse de l'incidence des CCR grâce au dépistage précoce, ces cancers restent un véritable problème de santé publique avec plus de 17 000 décès estimés en France durant l'année 2012[368]. Plusieurs facteurs de risque sont associés au développement d'un CCR. Ils peuvent être regroupés en deux grandes catégories : les facteurs de risque dits « modifiables » tels que les facteurs environnementaux (la consommation de viande rouge, un régime alimentaire riche en matières grasses, un apport insuffisant en fibre, l'obésité, la sédentarité, le tabagisme et une forte consommation d' alcool) et le mode de vie[369,370], et ceux dits « non modifiables » comme l'âge, le sexe et les différents facteurs de prédisposition génétique aux CCR. Une histoire familiale ou une histoire personnelle de CCR, des polypes colorectaux, les maladies inflammatoires de l'intestin ou la maladie de Crohn sont les principaux facteurs qui prédisposent au développement d'un CCR. Le risque de développer un CCR est important chez une personne dont un (ou plusieurs) apparenté(s) au premier degré (parent, frère, sœur, ou enfant) a (ont) déjà eu un CCR[371]**.** Les personnes atteintes de certaines altérations génétiques héréditaires, telles que la polypose adénomateuse familiale (FAP pour *Familial Adenomatous Polyposis*) ou le syndrome de Lynch précédemment nommé cancer colorectal héréditaire non polyposique ou *HNPCC* (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*), courent un risque encore plus élevé de développer un CCR[372]**.**

Les CCR sont associés à une instabilité chromosomique (IC) ou à une instabilité microsatellitaire (IMS). Récemment, un consortium international d'experts a permis de classer les CCR en différents sous-types moléculaires (CMS1-4 : *Consensus Molecular Subtypes*)[373]. Cette classification est basée sur des facteurs moléculaires, biologiques et cliniques des CCR (Tableau 4). Elle a pour but de mieux établir le pronostic clinique et de fournir une base pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les CCR. De cette classification se dégage le CMS1, qui regroupe les patients atteints de CCR à IMS, et le CMS2 où l'on retrouve les patients atteints de CCR à IC.

CMS1	13 %	MSI, hypermuté, *BRAF* muté, activation immunitaire, sexe féminin, âge élevé, côlon droit	Meilleure SSR SG intermédiaire Mauvaise SAR
CMS2	35 %	MSS, CIN *high*, TP53 muté, côlon gauche, EGFR surexprimé/ amplifié, activation de la voie WNT/CMYC	SSR intermédiaire Meilleure OS Meilleure SAR
CMS3	11 %	Épithélial, MSI/CIN, KRAS muté, MYC amplifié, IGFBP2 surexprimé	SSR, OS et SAR intermédiaires
CMS4	20 %	Jeune âge, stades III/ IV, CIN/MSI, TGFβ/ VEGF activés, NOTCH3 surexprimé	Mauvaise SSR Mauvaise OS SAR intermédiaire
Inclassés	21 %		SSR, OS et SAR intermédiaires

Tableau 4 : Classification moléculaire des cancers colorectaux d'après la présentation de Rodrigo Dienstmann, ASCO 2014

Extrait de Cohen et al. Bull Cancer; 102: S72–S81 (2015)

A. Instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est l'instabilité génomique la plus communément observée dans le cancer du colon. Elle se produit dans 80 à 85% des tumeurs colorectales[374,375]. L'IC se caractérise par des gains ou pertes de grandes portions de chromosomes. Il en résulte aneuploïdie, perte d'hétérozygotie, amplifications géniques et translocations. Les mécanismes de l'IC dans les CCR ne sont pas bien établis, mais ils impliquent probablement un dysfonctionnement de gènes régulant la ségrégation des chromosomes et l'allongement des télomères[376,377]. Les tumeurs associées à une IC sont également désignées parfois comme étant « à microsatellites stables » (MSS), ce qui permet de les différencier des tumeurs à IMS. L'IC est souvent associée à des mutations du gène

APC[376]. La mutation d'*APC* est héritée dans le syndrome de la polypose adénomateuse familiale (PAF), des centaines de polypes adénomateux se développant avec un risque de près de 100% de formation d'un CCR à partir de l'un des adénomes. Cette voie est plus communément appelée la « voie de suppression » pour la carcinogenèse colorectale compte tenu de la fonction du gène *APC* comme gène suppresseur de tumeur. Les mutations d'*APC* sont principalement des mutations inactivatrices trouvées dans environ 80% des adénomes et des carcinomes, qui surviennent très tôt dans le processus de carcinogenèse. Celles-ci conduisent généralement à la production d'une protéine APC tronquée et à la dérégulation de la voie de signalisation WNT/APC/β-caténine. L'IC peut être due aussi à l'accumulation d'autres mutations dans des oncogènes tels que *KRAS* et des gènes suppresseurs de tumeur au niveau des régions *3p21* (gène de la *β-caténine*), *9p* (gènes *p16* et *p15*), *13q* (gène *RB*), *17p* (gène *TP53*), *17q* (gène *BRCA1*), *18q* (gènes *DCC et SMAD4*), et moins fréquemment *16q* (gène *de l'E-cadhérine*)[378].

B. Instabilité microsatellitaire (IMS)

L'IMS est observée dans 15% des cancers colorectaux et se caractérise dans la grande majorité des cas par des insertions ou délétions de bases au sein de séquences répétées. L'IMS correspond à la variation anormale du nombre de séquences répétées dans l'ADN tumoral comparé à l'ADN du même patient provenant de tissu sain. Cette instabilité ne touche pas que les microsatellites non codants, mais elle peut également affecter de petites séquences répétées contenues dans les parties codantes des gènes. Les microsatellites sont des séquences d'ADN constituées d'un motif nucléotidique répété sur quelques dizaines de paires de bases. Ils sont sujets à des modifications lors de la réplication, en raison d'« erreurs » liées à leur nature répétitive. En général, ces erreurs peuvent être corrigées par le système MMR (*Mismatch Repair system*) pour maintenir la stabilité des microsatellites. Lorsque le système MMR est déficient en raison d'événements génétiques ou épigénétiques, cela conduit à une instabilité microsatellitaire.

1. Système de réparation des mésappariements de l'ADN

a. Fonctionnement

Lors de la synthèse de l'ADN, suite à des erreurs de l'ADN polymérase, des mésappariements et des insertions ou des délétions de bases peuvent survenir. Le système de réparation des mésappariements de l'ADN, ou système MMR (*DNA Mismatch Repair system*), se charge de corriger ces erreurs afin de maintenir la stabilité génomique. Outre la correction des erreurs lors de la synthèse de l'ADN, le système MMR assure également la fidélité de la recombinaison génétique et participe aux étapes initiales de la réponse apoptotique suite à différents dommages de l'ADN. Le système MMR est composé d'un ensemble de protéines telles que MLH1 (*MutL Homolog 1*), MLH3 (*MutL Homolog 3*), MSH2 (*MutS Homolog 2*), MSH3 (*MutS Homolog 3*), MSH6 (*MutS Homolog 6*), PMS1 (*Postmeiotic Segregation increased 1*) et PMS2 (*Postmeiotic Segregation increased 2*) intervenant dans les processus de réparation (Figure 16)[379]. Ces protéines MMR fonctionnent en formant des complexes hétérodimériques. Lorsque deux bases sont mésappariées ou qu'une base a été insérée ou délétée, la légère déformation subie par la double hélice d'ADN est détectée par un hétérodimère MSH2-MSH6 qui recrute l'hétérodimère MLH1-PMS2. Ces protéines permettent l'intervention d'enzymes qui corrigent le mésappariement. Tout d'abord, une exonucléase 1 érode le brin contenant la base mésappariée, puis une ADN polymérase δ allonge correctement le brin en cours de synthèse, finalement ressoudé par une ADN ligase I[380].

b. Inactivation

Lorsque les erreurs commises par l'ADN polymérase ne sont pas réparées, le nouveau brin d'ADN non corrigé sera utilisé comme matrice lors d'une seconde réplication et la mutation va donc être transmise au génome de l'une des cellules filles. C'est le processus qui a lieu dans les CCR à IMS lorsque le système MMR est déficient. Les CCR à IMS sont également appelés CCR de phénotype RER pour *Replication Errors*.

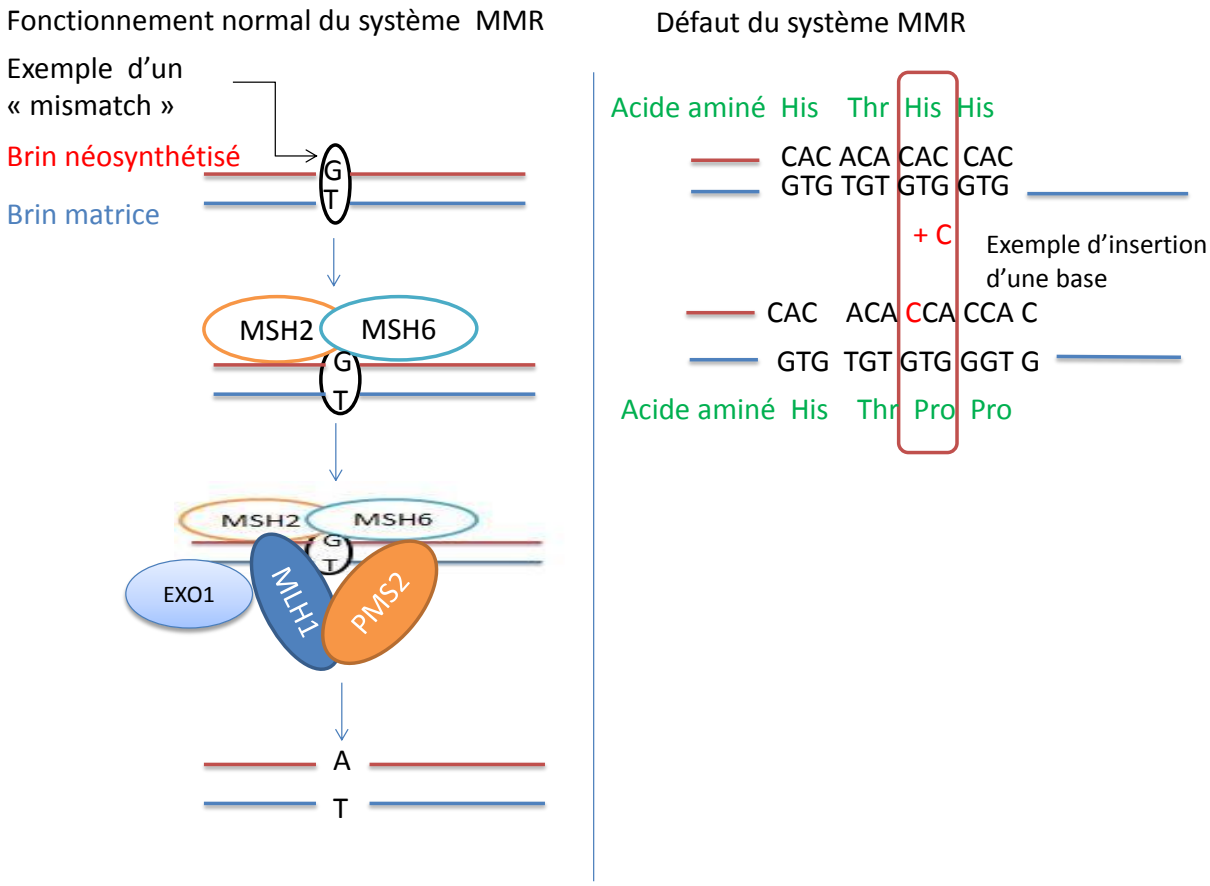


Figure 16 : Fonctionnement du système MMR (*Mismatch Repair System*)

Le système MMR est composé de plusieurs protéines, dont les plus importantes sont MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. Lorsque deux bases sont mésappariées ou qu'une base a été insérée ou délétée, l'hétérodimère MSH2-MSH6 recrute l'hétérodimère MLH1-PMS2. Ces protéines permettent l'intervention d'enzymes qui corrigent le mésappariement. L'exonucléase 1 érode d'abord le brin contenant la base mésappariée, ensuite une ADN polymérase δ allonge correctement le brin en cours de synthèse, finalement ressoudé par une ADN ligase I.

2. Le syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch représente environ 3 à 4% de tous les CCR et moins d'un tiers de tous les CCR à IMS. C'est un syndrome héréditaire autosomique dominant, causé par un défaut des protéines du système MMR résultant d'une mutation germinale d'un des gènes du système MMR, suivie de la perte de fonction de l'autre allèle[381]. Les gènes communément mutés sont *MLH1* et *MSH2*, et rarement *MSH6* ou *PMS2*. La perte de fonction du second allèle est due à une mutation somatique, à une perte d'hétérozygotie ou à la méthylation d'un promoteur. La maladie se développe suite à la perte de fonction du second allèle. Une

mutation germinale d'*EpCAM* (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), un gène situé en amont de *MSH2*, peut provoquer une inactivation épigénétique de *MSH2* conduisant au développement d'un syndrome de Lynch[382]. Le syndrome de Lynch se caractérise par une survenue à un âge précoce. En outre, les patients atteints d'un syndrome de Lynch ont un risque accru de développer des tumeurs malignes extracoliques, dans l'endomètre, les ovaires, l'estomac, l'intestin grêle, les voies urinaires et les glandes sébacées[380].

3. Le CCR sporadique à IMS

Les CCR sporadiques à IMS sont souvent causés par l'hyperméthylation des îlots CpG dans les régions promotrices des deux copies du gène *MLH1*[375]. Des mutations des gènes *MSH2*, *MSH6*, *MLH3*, *PMS2* et *EXO1* peuvent également jouer un rôle dans le développement de ces CCR sporadiques à IMS[383].

Dans les deux types de CCR à IMS (syndrome de Lynch et CCR sporadique), l'inactivation du système MMR conduit à l'accumulation d'insertions et de délétions dans les séquences répétées d'ADN du génome du patient, et finalement à d'autres mutations de l'ADN. Plusieurs mutations décalant le cadre de lecture résultant du défaut du système MMR ont été directement liées au développement de CCR à IMS.

II. Les néoantigènes tumoraux dans les CCR à IMS : « Frameshift Peptides » (FSP)

Avec le défaut de l'activité MMR, les mésappariements, insertions et délétions s'accumulent rapidement. Il a été observé qu'en moyenne, environ 1 300 substitutions de bases sont acquises chez les patients atteints de syndrome de Lynch, alors que seulement 190 substitutions de bases sont présentes dans les tumeurs à microsatellites stables[384]. De même, les CCR sporadiques à IMS ont un nombre nettement plus élevé de substitutions de bases par rapport aux CCR à MSS. En plus de ces substitutions de bases, un grand nombre d'insertions et de délétions est observé dans les CCR à IMS. Lorsque ces insertions ou délétions se produisent au niveau de séquences répétées codantes du génome, cela conduit à un décalage du cadre de lecture des gènes affectés. Ces mutations décalant le cadre de lecture peuvent se produire dans des gènes suppresseurs de tumeur spécifiques, qui sont sensibles à ces mutations car ils contiennent des séquences répétées codantes[385]. Par exemple, des mutations

du cadre de lecture sont fréquemment observées dans les séquences répétées mononucléotidiques de gènes suppresseurs de tumeurs comme *APC*, *BAX* et *TGFβR2*[386]. Ces mutations somatiques décalant de lecture dans les gènes *APC*, *BAX* et *TGFβR2* sont respectivement observées dans environ 70%, 50% et 90% des CCR à IMS.

Les mutations décalant le cadre de lecture peuvent conduire à la génération de nouvelles protéines fragmentées en peptides appelés « frameshift peptides » (*FSPs*)[307]. Ces néoantigènes suivent la voie classique de dégradation des protéines par le protéasome et les néopeptides résultant de cette dégradation sont transportés dans le réticulum endoplasmique par la machinerie TAP pour accéder aux molécules du CMH. Lorsque les peptides se lient aux molécules du CMH-I, le complexe CMH-peptide ainsi assemblé quitte le RE pour être présenté à la surface de la cellule. Au sein de chaque tumeur, des néoantigènes spécifiques s'accumulent. L'accumulation d'environ 40 épitopes uniques pour l'ensemble des molécules du CMH-I par individu atteint d'un CCR à IMS a été observée[388].

Les néopeptides issus de la fragmentation de néoantigènes sont potentiellement immunogènes. Parmi les FSP, le premier à avoir été décrit comme immunogène est FSP02 (RLSSCVPVA). Il dérive de la fragmentation d'un néoantigène issu de la mutation (-1) du gène codant le récepteur du TGFβ de type II (*TGFβRII* (-1)). Cette mutation se produit dans une séquence poly A (10 résidus Adénine) de l'exon 3 du gène *TGFβRII* (Figure 17)[307]. Les FSP possédant une affinité suffisante pour les molécules du CMH de classe I exprimées par l'individu sont présentés à la surface des cellules tumorales aux LT. Ces FSP sont capables de stimuler fortement les LTC lorsqu'ils sont présentés de manière immunogène par des cellules présentatrices d'antigène. Il en résultera une destruction spécifique des cellules tumorales présentant ces néopeptides. Chez les patients atteints d'un CCR à IMS, la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique des FSP suggère que ces peptides pourraient être utilisés comme antigènes cibles pour une immunothérapie anti-tumorale spécifique personnalisée[389].

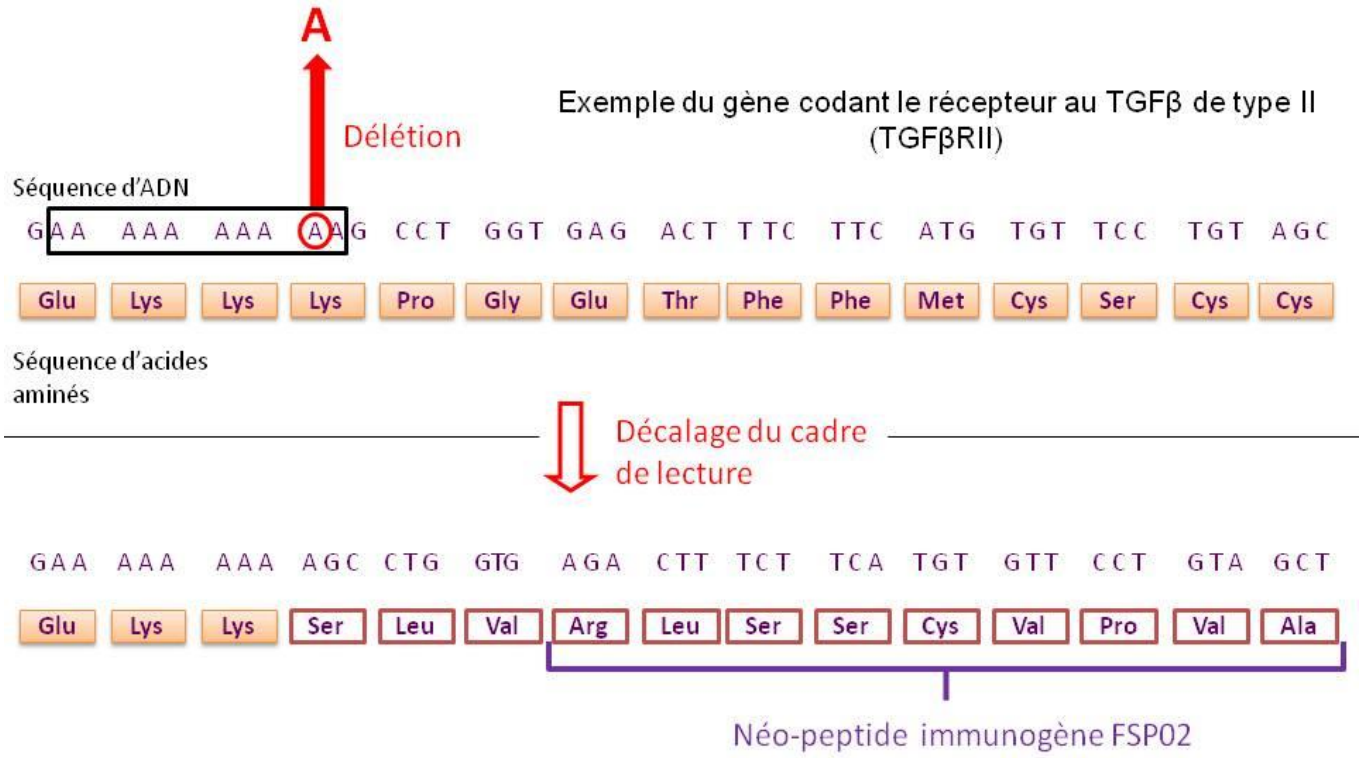


Figure 17 : Mutation par décalage du cadre de lecture - exemple du gène du récepteur du TGFβ de type II (*TGFβRII*)

La perte d'une adénine dans la séquence codante de 10 A de ce gène décale le cadre de lecture et engendre la synthèse d'une nouvelle protéine contenant la séquence peptidique RLSSCVPVA, appelée FSP02.

III. Réponse immunitaire dans les CCR à IMS

Chez un individu sain, le principal chef d'orchestre de la réponse immunitaire est la cellule dendritique qui patrouille dans tout le corps à la recherche de signaux de danger ou de signes d'inflammation. Une fois qu'elle détecte des cellules tumorales ou des particules nécrotiques, elle peut s'activer, endocyter des antigènes tumoraux exogènes, apprêter ces antigènes tumoraux par différentes voies lytiques et présenter des épitopes tumoraux qui en dérivent sur les molécules du CMH-I et du CMH-II à sa surface. Par la suite, elle migre à travers le système lymphatique vers les ganglions lymphatiques où les LB et les LT résident. Comme mentionné précédemment, les LT jouent un rôle central dans la réponse anti-tumorale. Les LT $CD4^+$ sont capables d'initier une commutation isotopique des LB et peuvent favoriser l'activation des LTC. Après l'activation des LT $CD4^+$ suite à l'interaction avec les cellules dendritiques exprimant des complexes CMH-II/antigène et des molécules co-stimulatrices, les LT $CD4^+$ deviennent matures et entrent dans la circulation. Ces cellules

expriment le ligand de CD40 et soutiennent les cellules dendritiques pour la stimulation et la différenciation des LTC par l'interaction avec CD40, ou directement par la production de cytokines. En revanche, quand les LTC sont activés, ils migrent vers le tissu tumoral pour remplir leur fonction effectrice. Ceci implique l'induction de l'apoptose par la production de perforine et de granzymes lors d'un contact avec des cellules tumorales portant le complexe CMH-peptide spécifique contre lequel le LTC a été activé. Les LTreg, exprimant CD25 et FoxP3, peuvent également être retrouvés dans le microenvironnement tumoral. Dans les organes lymphoïdes secondaires, ils maintiennent la tolérance aux auto-antigènes par la suppression ou la régulation négative des LT effecteurs auto-réactifs en inhibant leur prolifération, alors que dans le microenvironnement de la tumeur, ils peuvent activement supprimer la réponse anti-tumorale.

Une densité importante de LT infiltrant les tumeurs représente une caractéristique commune des CCR, et en particulier des CCR à IMS[182]. En effet, les CCR à IMS sont caractérisés par une densité plus importante de lymphocytes infiltrant la tumeur, associée à un meilleur pronostic[97]. Dans les CCR à IMS, il a été trouvé un plus grand nombre de LTC $CD8^+$ actifs et un pourcentage plus important de cellules cancéreuses subissant l'apoptose. De plus, les cellules apoptotiques étaient majoritairement localisées à proximité des cellules $CD8^+$, suggérant que ces LTC élimineraient ces cellules tumorales[390]. Des études *in vitro* et *in vivo*, phénotypiques et histopathologiques, ont démontré que LT $CD4^+$ et LTC sont attirés dans le tissu tumoral et sont réactifs contre des épitopes spécifiques de la tumeur[182,300,389,391–393]. Ces LT sont spécifiques de néoépitopes résultant de mutations décalant le cadre de lecture. En plus de mutations décalant le cadre de lecture de gènes suppresseurs de tumeur précédemment mentionnés comme *APC* (impliqué dans la voie Wnt), *BAX* (lié à l'apoptose) et *TGFβR2* (impliqué dans la transduction du signal), des mutations décalant le cadre de lecture sont aussi fréquemment identifiées dans les gènes *TP53* (rôle dans l'apoptose, la stabilité génomique et l'inhibition de l'angiogenèse), *OGT* (impliqué dans la translocation et la modification de protéines), et *CASP5* (rôle dans l'inflammation)[394–397]. Des réponses T cytotoxiques spécifiques chez des patients ayant un CCR sporadique à IMS ont été observées contre des peptides dérivés de ces mutations d'*OGT*[394], de *TGFβRII* [393] et de *CAPS5*[392]. Par rapport aux CCR à MSS, les cellules dendritiques dans les CCR à IMS expriment des niveaux plus élevés de molécules co-stimulatrices, ce qui est nécessaire pour une activation correcte des LT. Ceci est probablement dû à la forte immunogénicité des tumeurs à IMS, qui expriment des niveaux élevés de molécules activatrices du système immunitaire telles que des protéines de choc

thermique et des cytokines pro-inflammatoires, et sont donc extrêmement efficaces dans le déclenchement de l'activation des cellules dendritiques[398]. Une surexpression de l'intégrine CD103, impliquée dans la migration des LT, a été observée sur les LT $CD8^+$ infiltrant les tumeurs à IMS, ce qui n'a pas été observé dans les tumeurs à MSS[399]. Une concentration élevée de granzyme B et de perforine dans les LT $CD8^+$ infiltrant les tumeurs à IMS a également été observée, soulignant leur statut réactif dans les tumeurs à IMS[390,398,400]. De plus, dans les tumeurs à IMS, les LT $CD4^+$ secrètent des quantités élevées de cytokines pro-inflammatoires qui influencent positivement la réponse anti-tumorale[398]. Cette action concertée des LT $CD4^+$ et des LTC a été considérée comme une condition préalable pour une réponse immunitaire anti-tumorale efficace et a été corrélée avec une survie plus élevée des patients atteints de CCR à IMS[401,402]. Les LTreg peuvent affecter négativement la réponse anti-tumorale par la suppression des LTC. Dans certaines études, il a été observé que les LTreg augmentaient leur niveau d'expression de CD103 et étaient capables d'infiltrer les tumeurs dans les CCR à IMS, mais pas dans les CCR à MSS. Cette infiltration des LTreg était négativement corrélée avec une réponse efficace des LTC anti-tumoraux[97,403]. Il a été également démontré qu'un ratio plus élevé de LT $CD8^+$/LTreg était corrélé avec un meilleur pronostic dans les CCR à IMS[404]. Le ratio LT $CD8^+$/LTreg pourrait donc être utilisé comme marqueur pronostique chez les patients atteints de CCR à IMS. Dans le même ordre d'idée, des études *in vitro* évaluant l'impact des LTreg sur les LTC spécifiques de FSP, ont montré que la déplétion des LTreg pourrait promouvoir l'activité des LTC[405] et que les antigènes qui sont reconnus par les LTreg pourraient avoir un impact sur leur capacité à supprimer les LT $CD8^+$. Contrairement à ces études, d'autres équipes ont découvert avec surprise que l'infiltrat en LTreg pourrait être associé à un bon pronostic[98–100]. Dans une étude réalisée par notre équipe sur les CCR à IMS, la densité de lymphocytes $FoxP3^+$ infiltrant la tumeur a été clairement associée à des caractéristiques tumorales moins invasives, et pourrait donc être indirectement associée à un meilleur pronostic[101]. De façon surprenante, Le Gouvello et collaborateurs ont révélé que les niveaux d'expression des ARNm de FoxP3, indiquant la présence de LTreg, étaient augmentés dans les tumeurs à MSS par rapport aux tumeurs à IMS[406]. Tous ces résultats contraires indiquent que plus de connaissances doivent être acquises pour comprendre pleinement le rôle des LTreg dans les tumeurs à IMS et à MSS.

En somme, une réponse immunitaire anti-tumorale efficace peut être déclenchée si la tumeur contient des protéines mutées qui sont présentées sur des molécules du CMH-I et reconnues comme non soi ou soi modifié par les LT. Plusieurs types de cellules immunitaires

ont un effet positif sur la réponse anti-tumorale, telles que les LTC infiltrant les CCR. Le fort infiltrat lymphocytaire, la réaction inflammatoire marquée et le bon pronostic associés aux CCR à IMS pourraient être expliqués par le statut particulier de ces tumeurs dans lesquelles des néoantigènes fortement immunogènes spécifiques des cellules cancéreuses sont observés.

IV. Approches d'immunothérapie dans les CCR à IMS

Le traitement actuel des CCR est basé principalement sur la chirurgie, la radiothérapie et/ou la chimiothérapie, en fonction du stade de la maladie. Induire des réponses durables à ces traitements reste difficile en raison de certaines différences observées entre les patients, telles que l'âge, mais aussi des influences génétiques inconnues et des différences dans les mécanismes d'échappement de la tumeur. Le groupe de Lynch a montré déjà en 1997 que les patients atteints de syndrome de Lynch par rapport aux patients atteints d'un CCR sporadique à IMS avaient une chance beaucoup plus élevée de survie à cinq ans[407]. En raison de fortes réponses immunitaires possibles contre des néoantigènes trouvés chez les patients atteints de CCR à IMS, l'immunothérapie visant à étendre et à renforcer ces réponses présente un grand intérêt. Récemment, deux études ont analysé les effets du microenvironnement tumoral des CCR à IMS et des molécules inhibitrices présentes sur les lymphocytes infiltrant les tumeurs spécifiques de néoantigènes[408,409]. Le groupe d'Housseau a rapporté que les tumeurs à IMS n'étaient pas totalement éliminées malgré les grandes quantités de lymphocytes infiltrant les tumeurs. En faisant de l'immunohistochimie, de la microdissection laser, de la qRT-PCR, de la cytométrie en flux et des analyses fonctionnelles, ils ont découvert qu'une grande quantité de molécules inhibitrices était exprimée dans les tumeurs MMR-déficientes et dans leur microenvironnement, notamment PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 (*Lymphocyte Activation Gene 3*) et l'indolamine-2,3-dioxygénase. Par conséquent, les tumeurs à IMS qui expriment des quantités élevées de néoantigènes pourraient augmenter leur niveau d'expression de molécules inhibitrices pour contrebalancer la grande quantité de cellules immunitaires infiltrantes. En outre, les inhibiteurs de « checkpoints » pourraient être particulièrement efficaces dans ce sous-type de CCR[408]. Dans un essai clinique de phase I, Le et ses collaborateurs ont noté que seulement un sur 33 patients atteints de CCR répondait à un anticorps monoclonal anti-PD-1[6,198]. Cette observation les a amenés à étudier la cause de cette réponse unique. Il s'est avéré que ce patient avait un CCR à IMS. Par la suite, un essai clinique de phase II a été lancé pour tester l'efficacité d'un anticorps monoclonal anti- PD-1,

le pembrolizumab, chez des patients atteints d'un CCR à IMS ou à MSS, et a souligné un net avantage du traitement pour les patients atteints de CCR à IMS[409]. Une autre stratégie exploitant le système immunitaire pour lutter contre les CCR à IMS est basée sur les vaccins à base de néoantigènes[410,411]. Brièvement, des vaccins à base de néoantigènes pourraient être développés grâce à l'analyse du génotype des cellules tumorales et à la prédiction par des algorithmes, *in silico*, de néopeptides tumoraux, complétée par des tests fonctionnels d'immunogénicité. Les peptides prédits pourraient également être utilisés pour une ICA ou pour des vaccins à base de cellules dendritiques.

Les néoantigènes ne sont pas exprimés dans le thymus, ils ne subissent donc pas la sélection négative, et sont du coup potentiellement plus immunogènes que les autres types d'antigènes associés aux tumeurs. Dans les CCR à IMS, la vaccination avec des néoantigènes immunogènes pourrait augmenter l'immunité des LT spécifiques de la tumeur *in vivo*. L'utilisation de néoantigènes pour une thérapie vaccinale ou de néopeptides pour une ICA personnalisée présente donc un grand intérêt potentiel. Toutefois, plusieurs limites doivent être prises en considération. Tout d'abord, il convient d'identifier les néoantigènes et les néoépitopes dérivés de ceux-ci spécifiques de la tumeur du patient. Ensuite, il convient de valider l'immunogénicité de ces néoantigènes et de ces néopeptides, notamment en étudiant les réponses des LT qu'ils génèrent. Le développement de stratégies d'immunothérapie spécifique de néoantigènes issus d'un décalage du cadre de lecture présente un réel potentiel clinique.

V. Les cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) développées au laboratoire, utilisées dans le cadre des CCR à IMS

Dans le but de proposer une stratégie d'immunothérapie basée sur le transfert adoptif de LT, un système artificiel de présentation d'antigène a été développé au laboratoire à partir de fibroblastes murins NIH/3T3[277], par transfert de gènes grâce à cinq vecteurs gammarétroviraux codant respectivement les molécules accessoires B7.1, ICAM-1 et LFA-3, la β2-microglobuline humaine et une chaîne lourde HLA de classe I, recréant ainsi une véritable synapse immunologique (Figure 18). Les cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) présentant l'antigène au sein de la molécule HLA de classe I A2.1, la plus fréquente, exprimée par environ 40% des individus, sont les plus utilisées au laboratoire. Il est important de préciser que ces CPAA sont capables de présenter un peptide immunogène

d'intérêt directement transduit, mais aussi de dégrader des antigènes entiers transduits et de les présenter sous forme de peptides immunogènes, comme le font des cellules humaines[412]. Les LT activés par des CPAA exprimant la protéine entière antigénique ou le peptide d'intérêt vont entraîner une lyse cellulaire spécifique. L'antigène est codé par un vecteur gammarétroviral dicistronique dans lequel le transgène d'intérêt est lié à une séquence codant la puromycine-N-acétyltransférase par un élément IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), permettant la sélection des cellules transduites par la puromycine. Ces CPAA présentent de nombreux avantages puisqu'elles se multiplient rapidement, constituent des lignées stables et sont très facilement transductibles. Elles permettent d'induire une réponse immunitaire cellulaire anti-virale ou anti-tumorale spécifique en activant efficacement et de façon reproductible des LTC spécifiques. Elles nous ont permis d'activer des LTC spécifiques d'antigènes viraux comme FMP (*Flux Matrix Protein*), pp65, protéine structurale du CMV (Cytomégalovirus), mais également des antigènes tumoraux tels que MART-1 (*Melanoma Antigen Recognized by T cells-1*), gp100 et hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*)[277].

Dans le cadre des CCR à IMS, des CPAA A2.1+ ont été développées au laboratoire, qui codent des néoantigènes spécifiques des tumeurs, sous forme de néopeptides A2.1-restreints ou sous forme de protéines entières, dégradées par ces CPAA en néopeptides A2.1-restreints.

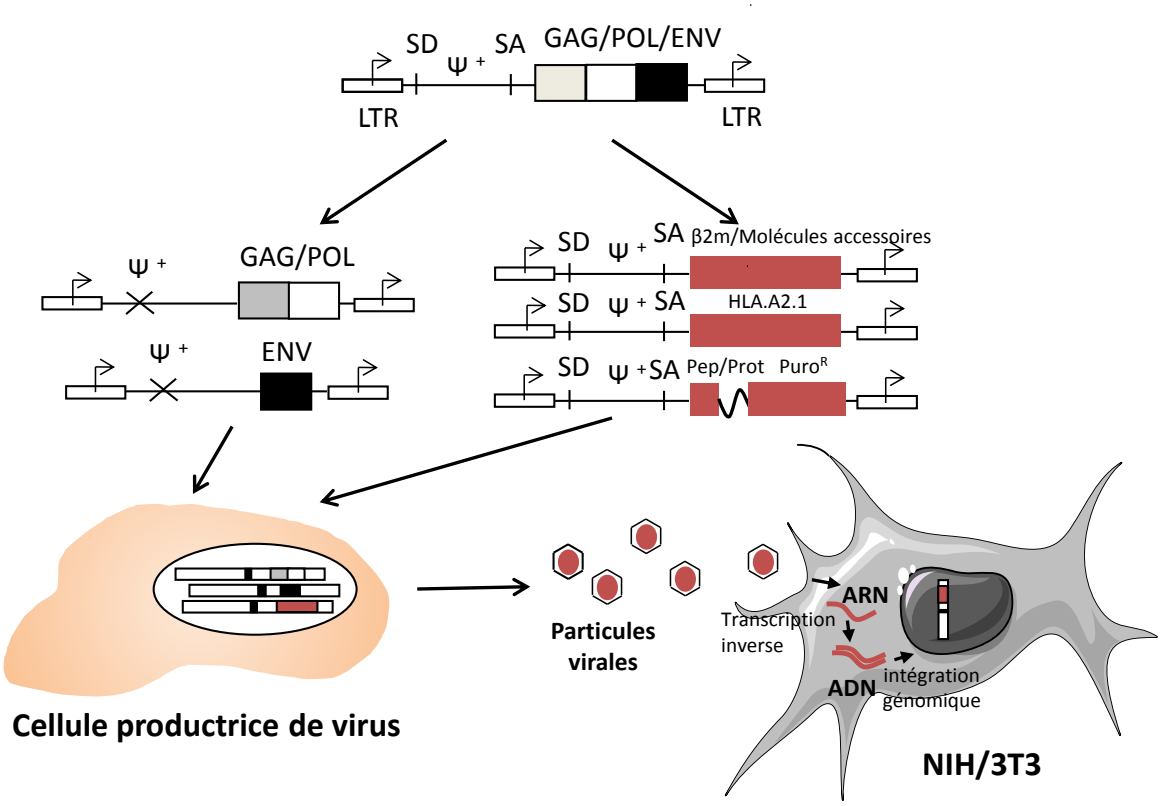


Figure 18 : Cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA)

Parmi les systèmes de présentation d'antigène artificiels cellulaires, des CPAA ont été générées à partir de fibroblastes murins transduits séquentiellement grâce à des vecteurs gammarétroviraux codant la chaîne lourde HLA A2.1, la β2 microglobuline (β2m) et un antigène sous forme de peptide (Pep) ou de protéine (Prot) afin de reconstituer le complexe du CMH de classe I. Ces cellules ont été également transduites avec trois molécules accessoires (B7.1, ICAM-1 et LFA-3). Ce système est capable d'activer et d'amplifier des lymphocytes T CD8+ spécifiques. Ce sont des lignées stables, facilement transductibles, et aucune xénoréactivité n'a été observée avec ce système dans les conditions de coculture établies.

LTR : *Long Terminal Repeat*

SD : Site Donneur d'épissage

SA : Site Accepteur d'épissage

Ψ^+ : signal d'encapsidation

$Puro^R$: « gène » de résistance à la puromycine

GAG/POL/ENV : protéines gammarétrovirales codées par la cellule productrice de virus

- Objectifs des travaux -

Dans le cadre du développement d'une stratégie d'immunothérapie cellulaire adoptive dans les cancers colorectaux (CCR), basée sur l'utilisation de cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA), diverses études ont été réalisées au laboratoire. Dans un premier temps, notre équipe s'est d'abord intéressée aux CCR « tout venant » avec l'étude de l'immunogénicité d'un antigène emblématique : l'antigène carcino-embryonnaire (ACE). Des cellules présentatrices d'antigène artificielles ont été utilisées afin de stimuler des lymphocytes T cytotoxiques contre l'ACE et contre CAP-1 (le peptide dérivé de l'ACE, longtemps considéré comme immunodominant dans le contexte HLA-A*0201), mais sans succès. L'hypothèse prédominante permettant d'expliquer l'absence de réponse contre l'ACE est que les LT spécifiques de cet autoantigène subissent des mécanismes de tolérance centrale et périphérique. Dans les CCR, les autoantigènes que l'on pourrait cibler sont donc sans doute sujets à des phénomènes importants de tolérance centrale et périphérique. Par contre, dans le groupe des CCR à IMS, dans de larges cohortes de patients, une densité importante de lymphocytes T infiltrant la tumeur a été retrouvée, associée à un meilleur pronostic. De plus, il est généralement admis que la présence de néoantigènes tumoraux, résultant d'un défaut du système de réparation des mésappariements de l'ADN, pourrait expliquer la réponse immunitaire forte et le bon pronostic associés à ces cancers. Dans ce contexte, notre équipe a réorienté son projet de stimulation d'une réponse immunitaire cellulaire dans les CCR vers l'activation de LT spécifiques de néoantigènes. Les phénomènes de tolérance du système immunitaire sont certainement moins importants pour ces néoantigènes, exprimés uniquement par les cellules tumorales, que pour des autoantigènes, surexprimés dans les tumeurs, mais également exprimés, même si à faible niveau, dans les tissus normaux. Dans ce cadre, pour une immunothérapie mettant en jeu l'immunité cellulaire, l'équipe s'est donc demandé quels seraient les néoantigènes à cibler et comment les caractériser.

Le premier volet de ce projet de thèse a consisté à développer une nouvelle méthodologie de caractérisation par spectrométrie de masse de néopeptides immunogènes d'intérêt thérapeutique issus de la dégradation de divers néoantigènes associés aux CCR à IMS récemment caractérisés au laboratoire[413]. Ces néoantigènes sont codés par nos CPAA sous forme de protéines entières ou de peptides HLA-restreints, et présentés au sein des molécules HLA-A2.1 exprimées à leur surface. Pour la caractérisation des néopeptides tumoraux potentiellement immunogènes, une immunoprécipitation des complexes HLA-A2.1-

peptide a été réalisée, suivie d'une élution des peptides présentés par les molécules HLA. Enfin, une caractérisation de la masse et de la composition en acides aminés de ces peptides a été effectuée par spectrométrie de masse. Les essais de validation de l'immunoprécipitation et de l'identification par spectrométrie de masse des peptides ont été réalisés avec le peptide modèle immunogène M1 dérivé de MART-1, auto-antigène surexprimé dans les mélanomes, et avec le premier néopeptide décrit comme immunogène dans les CCR à IMS, FSP02, dérivé d'une protéine TGFBRII mutée. Ce projet a été mené en étroite collaboration avec l'équipe de la Plateforme de Protéomique PISSARO de l'Université de Rouen.

Le second volet de ce projet, développé dans un but clinique, a consisté à activer *in vitro* des LT du sang périphérique d'un patient IMS donné contre des néopeptides prédits, potentiellement issus de mutations *frameshift* retrouvées dans sa tumeur. Cette « stimulation personnalisée » est basée sur l'utilisation de CPAA codant des néoépitopes tumoraux prédits *in silico* grâce à des logiciels bioinformatiques, déjà décrits dans la littérature, résultant de gènes mutés et retrouvés dans les tumeurs étudiées au laboratoire, notamment chez des patients ayant accepté de participer à cette étude[413].

- Résultats -

Partie I : caractérisation de peptides immunogènes HLA-A2.1 restreints dans le cadre des cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire

I. Mise au point de l'outil de caractérisation des peptides HLA restreints à partir de cellules présentatrices d'antigène artificielles

A. Contexte scientifique

Au laboratoire, des études précédentes ont conduit à la mise au point de PCR multiplexes fluorescentes, permettant la détection de mutations décalant le cadre de lecture chez des patients atteints de CCR à IMS. Dans ces précédentes études, des tissus colorectaux ont été collectés chez 87 patients atteints de CCR à IMS ayant été opérés au CHU de Rouen. L'IMS a été détectée au laboratoire de génétique somatique des tumeurs. Une analyse de 19 gènes correspondant à 22 séquences répétées codantes a été réalisée par PCR multiplexes. La fréquence et la nature des mutations affectant ces 19 gènes rigoureusement sélectionnés ont déjà été déterminées[413,414]. Les néopeptides dérivées de ces mutations ont été prédits *in silico* sur la base des données disponibles sur le génome humain. La prédiction *in silico* n'étant pas toujours fiable, nous avons donc voulu développer une nouvelle méthode d'identification par spectrométrie de masse (Figure 19) des néopeptides potentiellement immunogènes dérivés de néoantigènes issus de mutations détectées grâce à nos PCR multiplexes. À notre connaissance, aucun néopeptide, dans le cadre des CCR à IMS, n'a été identifié par cette méthode jusqu'à présent. Dans la littérature, selon le matériel biologique de départ (lignées cellulaires, cellules tumorales primaires, tissus congelés ou cellules sanguines) utilisé, les conditions de solubilisation des complexes HLA-peptide, d'immunoprécipitation et d'analyse par spectrométrie de masse de ces complexes diffèrent d'un protocole à l'autre[343–345]. Pour notre étude, nous avons utilisé des CPAA, qui à notre connaissance n'ont jamais été utilisées dans un protocole d'élution de peptides HLA-restreints. Il nous a donc fallu mettre d'abord au point un protocole permettant de détecter des peptides HLA-restreints en partant de nos CPAA. Les mises au point ont été basées sur les travaux de l'équipe de H.G. Rammensee, spécialiste de l'étude des peptides HLA-restreints.

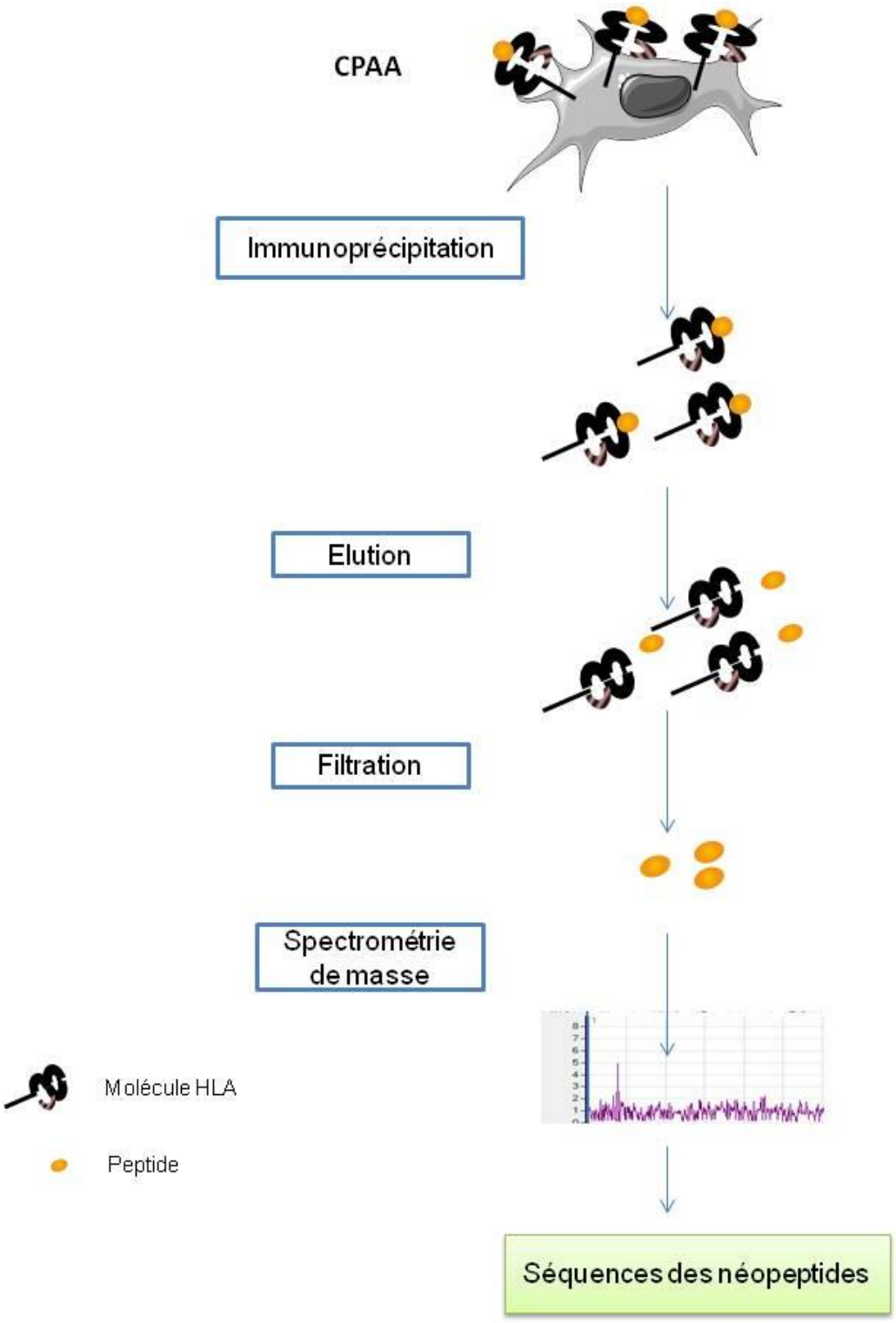


Figure 19 : Résumé des grandes étapes de l'élution de peptide

Les peptides issus de néoantigènes tumoraux et présentés par les molécules HLA-A2.1 exprimées par les CPAA sont identifiés après une immunoprécipitation des complexes HLA-A2.1-peptide, suivie d'une élution de ces peptides. Les éluats sont ensuite filtrés et une étude de la masse et de la composition en acides aminés des néopeptides est effectuée par spectrométrie de masse.

B. Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire des cellules NIH/3T3 et des cellules présentatrices d'antigène artificielles

Les fibroblastes murins NIH/3T3 (ATCC, *American Type Culture Collection*, Manassas, VA) et les cellules présentatrices d'antigènes artificielles ($CPAA^{A2.1}$, codant la molécule HLA A2.1, $CPAA^{A2.1/M1}$, codant la molécule HLA A2.1 et le peptide M1 A2.1-restreint et $CPAA^{A2.1/FSP02}$, codant la molécule HLA A2.1 et le peptide FSP02 A2.1-restreint) qui en dérivent, ont été cultivés dans du *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) contenant 4 g/L de glucose auquel ont été rajoutés 10% de *Donor Calf Serum* (DCS, Hyclone, ThermoFisher Scientific), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen, Saint Aubin, France) et un mélange d'antibiotiques (pénicilline 100 UI/mL et streptomycine 10 µg/mL, Invitrogen). Les cellules ont été incubées à 37°C en présence de 5% de CO_2 sous atmosphère humide.

2. Vérification du phénotype des cellules présentatrices d'antigène artificielles

L'étude phénotypique des CPAA a été réalisée par cytométrie en flux. Les cellules (100 000) ont été incubées à 4°C pendant 30 minutes avec 2 µg de chacun des anticorps suivants couplés à des fluorochromes : anti-HLA A2-FITC (Fluoresceine Iso-Thyo-Cyanate), anti-CD54-PE (Phyco-Erythrin), anti-CD58-FITC et anti-CD80-FITC commercialisés par Invitrogen. Ces anticorps ont permis de déterminer respectivement l'expression des molécules HLA A2.1, ICAM-1 (CD54), LFA-3(CD58) et B7.1 (CD80). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 150 g pendant 5 minutes et le culot a été repris dans du PBS 1x (*Phosphate Buffer Saline,* Invitrogen) contenant 0,1% de BSA et 2 mM d'EDTA. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux sur un FACScanto (Beckton Dickinson, Inserm U905, IRIB, Rouen) et les résultats ont été analysés avec le logiciel FlowJo version 9.3 (Tree Star, Ashland, OR). Pour le peptide immunogène, les cellules ont été sélectionnées à la puromycine (10 µg/mL).

3. Vérification de la qualité de l'anticorps immunoprécipitant anti-HLA A2

La qualité de l'anticorps anti-HLA A2 (clone BB7.2, Abcam, Cambridge, UK), validé par le fournisseur pour une utilisation en immunoprécipitation et en cytométrie en flux, a été vérifiée en cytométrie avec nos CPAA. L'expérience a été réalisée dans les conditions décrites ci-dessus. En revanche, les cellules ont d'abord été incubées avec 1 µg d'anticorps primaire anti-HLA A2, clone BB7.2, non couplé à un fluorochrome, puis avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la molécule FITC (BD Pharmigen, Le Pont de Claix, France) avant analyse.

4. Extraction protéique des cellules NIH/3T3 et des cellules présentatrices d'antigène artificielles

Après retrait du milieu de culture et lavage des cellules au PBS 1x, les boîtes de culture ont été mises sur glace et les cellules ont été récupérées par décollement mécanique à l'aide d'un grattoir, dans du PBS 1x froid (4°C). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 660 g à 4°C pendant 5 minutes, et les culots cellulaires obtenus ont été repris dans un tampon de lyse. Deux tampons de lyse ont été testés au cours de cette étude : le tampon RIPA (*Radio Immunoprecipitation Assay*, Calbiochem, La Jolla, CA) et un second tampon recommandé par Abcam que nous appellerons tampon Abcam par la suite. Le tampon RIPA contient 50 mM de Tris–HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 20 mM d'EDTA, 1% de Nonidet-P40 (NP40), et le tampon Abcam 50 mM de Tris pH 7,4, 250 mM de NaCl, 0,1% de NP40, 2 mM d'EDTA, 10% de glycérol. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1%, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et 1% d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (1%, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) ont été ajoutés à chaque tampon avant la lyse. La lyse cellulaire a été faite pendant une incubation de 30 minutes sur glace. Les suspensions ont alors été centrifugées à 15.300 g pendant 15 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires, et les concentrations de protéines ont été mesurées en utilisant le kit de dosage de protéines DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). En prévision de l'analyse par Western Blot (séparation des protéines selon leur poids moléculaire apparent), un volume d'extrait protéique contenant au moins 50 µg de protéines a été prélevé et conservé à -80°C. Les suspensions protéiques ont ensuite été utilisées pour des expériences d'immunoprécipitation de la protéine HLA A2.1.

5. Western Blot et immunomarquage de la protéine HLA

Cinquante µg de protéines provenant de l'extrait protéique brut des cellules NIH/3T3, $CPAA^{A2.1}$, $CPAA^{A2.1/M1}$ et $CPAA^{A2.1/FSP02}$, ou des surnageants d'immunoprécipitation de ces 4 types cellulaires, ont été déposés sur un gel d'acrylamide 12,5%. Les protéines ont été analysées en SDS-PAGE, ce qui a permis de les séparer uniquement en fonction de leur poids moléculaire apparent. La séparation a été effectuée dans des conditions dénaturantes réductrices (en présence de DTT : Dithiothreitol). Les protéines séparées ont été transférées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C-Extra, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). La membrane a ensuite été saturée par une solution de blocage (lait écrémé 5% et Tween 20 0,05% dans du PBS 1x) durant 1h puis incubée avec l'anticorps primaire anti-HLA ABC (clone EMR8-5, Abcam) dilué au $1000^{ème}$ dans la solution de blocage durant toute la nuit. Après 3 rinçages dans une solution de PBS-Tween 20 0,05%, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase adapté à l'anticorps primaire utilisé et dilué au $10\ 000^{ème}$ dans la solution de blocage (Jackson Immunoresearch Laboratories, Westgrove, PA). Les complexes anticorps-protéine obtenus sur la membrane ont ensuite été révélés avec de l'ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, Pierce Biotechnology), un réactif de chémoluminescence substrat de la peroxydase, dont la membrane a été recouverte durant 1 minute 30 secondes. Les signaux ont été détectés avec une GBOX (Syngene, Cambridge, UK), contrôlée par le logiciel Gene Snap (Syngene). L'intensité du signal pour chaque bande a enfin été quantifiée en utilisant le logiciel Gene Tools (Syngene).

6. Immunoprécipitation

a. Etape de « preclearing »

Un volume contenant 500 ou 750 µg de protéines a été ajouté à 50µl de billes de sépharose / protéine A (Invitrogen) préalablement rincées dans un tampon de lavage (50mM de Tris 7,4 pH 7,4, 250mM de NaCl, 0,1% de NP40, 2mM d'EDTA). Le mélange billes / extrait protéique a été incubé pendant 1 h à 4°C sous agitation sans l'anticorps anti-HLA A2. L'étape de « preclearing » permet d'éliminer toutes les protéines qui se fixent de façon non spécifique aux billes de sépharose / protéine A. L'échantillon a ensuite été centrifugé pendant

5 minutes à 660 g. Après cette étape, 2 procédures d'immunoprécipitation ont été testées pour la suite de l'expérience (Figure 20).

b. Procédure A : incubation de l'extrait protéique avec l'anticorps anti-HLA A2 puis addition des billes de sépharose

Le surnageant obtenu après " preclearing " a été transféré dans un nouveau tube, puis 5 µg d'anticorps anti-HLA A2 (clone BB7.2) ont été ajoutés. Le mélange extrait protéique / anticorps anti-HLA A2 a été incubé pendant 1 h à 4°C sous agitation puis transféré dans un nouveau tube contenant 50µl de billes de sépharose / protéine A. Le mélange extrait protéique / anticorps anti-HLA A2 / billes a été incubé 1 h à 4°C sous agitation, puis centrifugé pendant 5 minutes à 660 g. Le surnageant récupéré constitue le surnageant d'immunoprécipitation. Les billes de sépharose culottées ont ensuite été lavées 3 fois dans le tampon de lavage, puis les complexes anticorps-molécules HLA A2 ont été élués.

c. Procédure B : incubation des billes de sépharose / protéine A avec l'anticorps anti-HLA A2 puis addition de l'extrait protéique

Des billes de sépharose / protéine A (50µL), préalablement rincées dans un tampon de lavage sans glycérol, ont été incubées avec 5 µg d'Ac anti-HLA A2 (clone BB7.2). Après 1 h d'incubation sous agitation, une centrifugation à 660 g a été effectuée. Le surnageant a été éliminé et les billes de sépharose culottées sur lesquelles est maintenant fixé l'anticorps anti-HLA A2, ont ensuite été incubées pendant 1h sous agitation avec l'extrait protéique provenant de l'étape de " preaclearing ". L'échantillon a ensuite été centrifugé pendant 5 minutes à 660 g. Le surnageant récupéré constitue le surnageant d'immunoprécipitation. Les billes de sépharose culottées ont ensuite été lavées 3 fois dans le tampon de lavage puis les complexes anticorps-molécules HLA A2 ont été élués.

7. Elution des complexes HLA A2

En fonction du type d'analyse effectuée (Western Blot ou spectrométrie de masse), deux conditions d'élution ont été réalisées.

Pour une analyse des immunoprécipitats par Western Blot, les billes ont été reprises dans du tampon de charge 1X (Bleu de bromophénol 0,1%, SDS 10%, Glycérol 50% et Tris

HCl pH 6,8) puis chauffées pendant 5 minutes à 95°C et centrifugées brièvement. L'éluat a été stocké à -80°C avant analyse.

Pour une analyse par spectrométrie de masse, les billes préalablement lavées avec un tampon sans détergent ont été reprises dans de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% compatible avec ce type d'analyse puis centrifugées brièvement. L'éluat a été conservé à -80°C avant analyse.

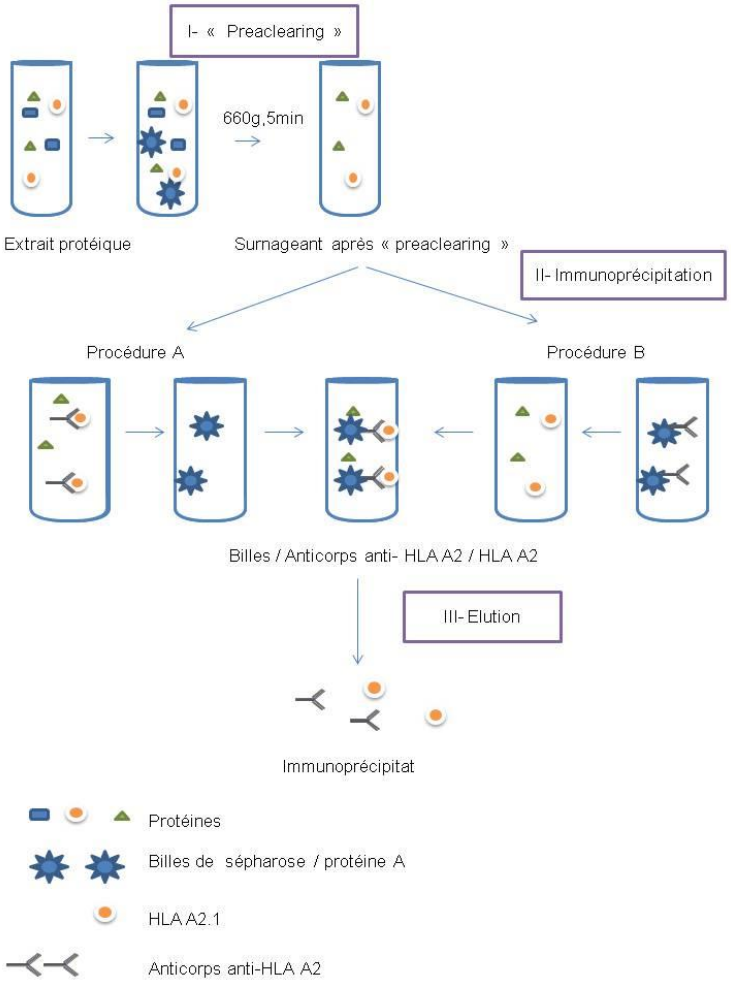


Figure 20 : Résumé global de la procédure de purification des complexes HLA A2.1

L'extrait protéique brut dérivé des cellules NIH/3T3 ou des CPAA est incubé avec des billes de sépharose / protéine A : c'est l'étape de « preclearing » qui permet d'éliminer toutes les protéines qui se fixent de façon non spécifique aux billes. Après cette étape, 2 procédures d'immunoprécipitation ont été testées. La procédure A dans laquelle le surnageant obtenu après « preclearing » est d'abord incubé avec l'anticorps immunoprécipitant anti-HLA-A2 (clone BB7.2) ou la procédure B dans laquelle des billes de sépharose / protéine A sont d'abord incubées avec l'anticorps immunoprécipitant anti-HLA-A2. Enfin, dans les deux cas, le mélange extrait protéique / anticorps anti-HLA-A2 / billes est incubé puis les complexes anticorps-molécules HLA-A2 sont élués.

8. Etape d'enrichissement des produits d'immunoprécipitation

a. Procédure A : enrichissement des produits d'immunoprécipitation en peptides par ultrafiltration

La colonne Amicon (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) à seuil de coupure de 10 kDa a été préalablement lavée par 2 x 300 µL d'acétonitrile (ACN) 3 % acide formique (AF) 0,1 % (v/v) par centrifugation à 14 000 g pendant 10 minutes. Les immunoprécipitats ont été ensuite filtrés par centrifugation comme décrit ci-dessus et les filtrats entièrement évaporés grâce à une centrifugeuse sous vide avec un système de chauffage (" speedvac ").

b. Procédure B : enrichissement et nettoyage des immunoprécipitats sur « tips » Omix C18

Les immunoprécipitats ont d'abord été entièrement évaporés par lyophilisation et les culots ont été repris dans 100 µL de TFA 0,1 %.

La colonne C18 (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France) a été successivement lavée par 2 x 100 µL d'acétonitrile (ACN) et 2 x 100 µL de tampon ACN 50 % AF 50 % (v/v), puis équilibrée par 4 x 100 µL de TFA 0,1 %. Les analytes ont été fixés sur « tips » C18 par 10 aspirations successives puis la colonne a été lavée par 5 x 100 µL d'AF 0,1 %. Les peptides ont été spécifiquement élués par 10 aspirations successives dans 3 x 100 µL d'ACN 40 % AF 0,1 %. Les éluats ont été regroupés et entièrement évaporés par lyophilisation. Les culots ont été repris dans 15 µL d'ACN 3 % AF 0,1 %, et les peptides analysés par spectrométrie de masse.

9. Spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide

a. Principe de la technologie nano LC-ESI-QTOF

La spectrométrie de masse existe sous de nombreuses formes différentes. C'est une technique qui repose sur la séparation et la détection de composés ionisés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Un spectromètre de masse est divisé en trois grandes parties fondamentales : la source d'ionisation qui transforme les molécules en ions, l'analyseur qui sépare les ions formés en fonction de leur rapport masse sur charge et le détecteur. Les protéines et les peptides sont très adaptés à une analyse par spectrométrie de masse en raison

de la capacité des acides aminés à s'ioniser. De plus, les composés protéiques et peptidiques peuvent être facilement séparés en amont par une chromatographie liquide. Cette séparation par chromatographie liquide repose sur les interactions hydrophobes et hydrophiles des analytes avec de longues chaînes alkyles liées à un support solide. Compte tenu de la complexité d'un protéome cellulaire, cette séparation est souvent indispensable pour avoir une certaine précision et la spécificité que l'on souhaite dans les expériences de protéomique. La spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide pour la détection d'épitopes peptidiques CMH-restreints peut donc être une approche de choix. Toutefois, pour une analyse optimale, il faut une certaine préparation en amont des échantillons des peptides purifiés. Il y a également des défis techniques à surmonter lors de la purification des peptides CMH-restreints à partir de cellules ou de tissus.

Pour la génération d'ions détectables à partir de protéines et de peptides, les stratégies les plus appropriées sont l'« ionisation electropspray » ou ESI (*Electrospray Ionisation*) et l'ionisation par désorption laser assistée par matrice ou MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*). Les deux techniques peuvent être appliquées en combinaison avec des systèmes de chromatographie en phase liquide à haute performance ou HPLC, mais l'ESI permet l'injection directe des peptides fractionnés et est donc plus simple et plus rapide. La spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide est aujourd'hui la technologie permettant l'identification rapide de plusieurs centaines de ligands du CMH dans différentes approches expérimentales[353]. Dans cette approche, un échantillon complexe est d'abord séparé par HPLC. Les analytes élués sont ensuite directement soumis à une ionisation douce par un dispositif ESI. Enfin, pour les analyses de séquence, les peptides sont fragmentés, dans une chambre de collision par un gaz de collision (par exemple, l'argon). Les spectres de masse des ions de fragments générés sont utilisés pour déduire la séquence peptidique. Même les peptides à partir de mélanges complexes peuvent être séquencés par spectrométrie de masse en raison de la capacité des instruments modernes de sélectionner des molécules précurseurs uniques pour la fragmentation. La plupart des instruments de spectrométrie de masse actuelle offrent une sensibilité pour les peptides CMH-restreints dans la gamme du femtomole ou en dessous, avec une précision de masse inférieure à 5 ppm.

Dans notre étude, une analyse par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide (nano LC-ESI-QTOF) a été effectuée sur les produits d'immunoprécipitation des molécules HLA-A2.1. La technologie nano LC-ESI-QTOF est constituée d'un spectromètre de masse directement couplé à une chromatographie liquide

(nano LC) qui permet une séparation préalable des composés et leur analyse séquentielle. La source ESI ou « ionisation electropspray » est un mode d'ionisation adapté à l'analyse des molécules polaires de moins de 100 Da à plus de 1 000 000 Da de masse moléculaire. Le QTOF est un spectromètre de masse en tandem, c'est à dire possédant deux analyseurs : le Quadripole (Q) et le temps de vol (TOF : *Time Of Flight*). Le premier analyseur (Q) sélectionne les ions sur la base de leur rapport masse sur charge (m/z), ce qui permet de générer des spectres MS (*Mass Spectrometry*). C'est en fait une étape de purification d'un ion présent dans un mélange très complexe d'ions. L'ion « purifié » est ensuite fragmenté dans une chambre de collision. Le deuxième analyseur (TOF) mesure les rapports masse sur charge (m/z) des fragments. C'est de la « MS-MS » (spectrométrie de masse en tandem). Le détecteur contrôle le courant d'ions, l'amplifie, et le signal est alors transmis au système de données, dans lequel il est enregistré sous la forme de spectres de masse.

b. Analyse nano LC-ESI-Q-TOF des échantillons

Les peptides purifiés sur colonne Amicon ou sur « tips » C18 ont été analysés sur un spectromètre de masse Q-TOF 6520 couplé à un système de nano-chromatographie LC1200 (Agilent Technologies) grâce à l'interface « chipcube ». Un gradient croissant d'acétonitrile de 3 à 70 % dans de l'acide formique 0.1% a été utilisé pour séparer les peptides sur une colonne de type polaris-HR-Chip C18 (150 mm de long x 75 µm de diamètre) à un débit de 370 nL/min pendant 25 minutes. Après l'analyse de chaque échantillon, la colonne a été lavée afin d'éviter des contaminations croisées puis reconditionnée avant l'étape d'analyse suivante. A chaque cycle MS, un maximum de 5 précurseurs ont été sélectionnés en fonction de leur abondance et de leur état de charge, et ont été fragmentés dans la cellule de collision. L'énergie de collision appliquée a été automatiquement ajustée en fonction du rapport m/z et de l'état de charge des précurseurs. Une liste de pics a été créée en utilisant le logiciel Masshunter Workstation Qualitative Analysis (Version B.04.00, Agilent Technologies). L'identification des séquences des peptides s'est faite par « séquençage *de novo* » à partir des données MS et MS/MS grâce au logiciel Peaks.

C. Résultats

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'expression des molécules HLA-A2.1, B7.1, ICAM-1 et LFA-3 à la membrane des cellules présentatrices d'antigène artificielles par cytométrie en flux. Un niveau d'expression élevé de ces quatre molécules transmembranaires a été observé (résultats non montrés). Ce niveau d'expression élevé a été observé même après plusieurs semaines en culture (résultats non montrés). Les CPAA expriment donc bien fortement de façon stable les molécules HLA-A2.1, B7.1, ICAM-1 et LFA-3. La résistance des cellules codant un antigène d'intérêt à la puromycine a été vérifiée (résultats non montrés).

L'anticorps anti-HLA-A2 (clone BB7.2) a été validé pour immunoprécipitation et cytométrie en flux par le fournisseur Abcam. Afin de confirmer la qualité de l'anticorps anti-HLA-A2 dirigé contre la protéine d'intérêt HLA-A2.1 exprimée par nos CPAA, le marquage par cet anticorps a été étudié par cytométrie en flux sur des $CPAA^{A2.1}$, en utilisant un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorochrome FITC. Le contrôle négatif a été obtenu en utilisant des cellules NIH/3T3 n'exprimant pas la molécule HLA-A2.1, et le contrôle isotypique, avec une IgG de souris couplée à la molécule FITC. Une forte expression de HLA-A2.1 (99,9%) a été observée dans les $CPAA^{A2.1}$ et aucun marquage non spécifique n'a été détecté sur les cellules NIH/3T3. L'anticorps anti- HLA A2 reconnaissait donc bien spécifiquement la molécule HLA-A2 en cytométrie en flux (Figure 21).

Ensuite, nous nous sommes intéressés au moyen de valider les expériences d'immunoprécipitation. En effet, une façon de confirmer l'efficacité de fixation de la protéine HLA-A2.1 par l'anticorps anti HLA-A2 après immunoprécipitation est de réaliser un Western Blot monodimensionnel permettant de séparer les protéines selon leur poids moléculaire apparent, afin de détecter la présence de la protéine HLA-A2.1 dans les immunoprécipitats. L'anticorps anti-HLA-A2 (clone BB7.2) non validé pour Western Blot par le fournisseur a été testé au laboratoire, et les résultats obtenus ont montré qu'il ne fonctionnait pas en Western Blot (données non présentées). L'anticorps anti-HLA-ABC validé pour Western Blot par le fournisseur et dirigé contre les chaînes lourdes A, B et C des molécules HLA de classe I a donc été utilisé pour réaliser les expériences de Western Blot. Puisque les CPAA expriment uniquement la chaîne lourde HLA-A2.1, cet anticorps ne détectera que la molécule HLA A2.1 dans ces CPAA par Western Blot. La protéine d'intérêt HLA-A2.1 a été étudiée en Western Blot sur des extraits protéiques provenant de cellules NIH/3T3, $CPAA^{A2.1}$ et $CPAA^{A2.1/M1}$. Le

Western Blot a été réalisé en condition dénaturante réductrice avec dTT. Aucun signal non spécifique n'a été détecté dans les cellules NIH/3T3. La protéine HLA-A2.1 a été observée à un poids moléculaire apparent de 43 kDa dans les $CPAA^{A2.1}$ et $CPAA^{A2.1/M1}$, mais avec différentes intensités de signal. L'anticorps anti-HLA-A, B et C a donc été utilisé par la suite pour valider l'efficacité de l'immunoprécipitation (Figure 22).

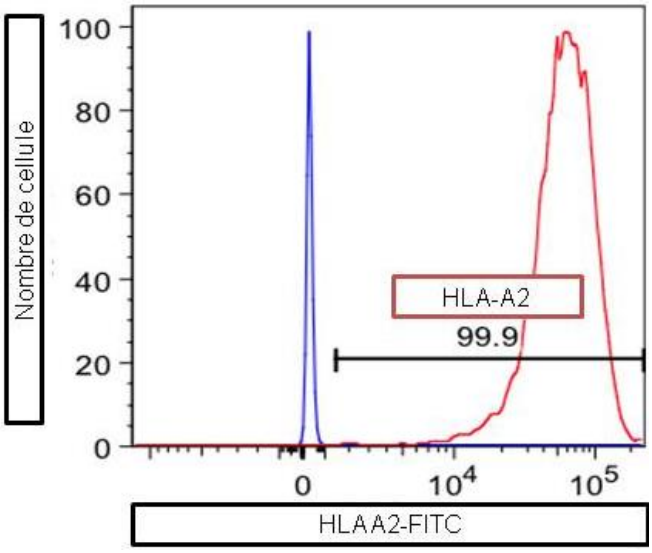


Figure 21 : Vérification de la qualité de l'anticorps immunoprécipitant anti-HLA-A2.1 (clone BB7.2)

La qualité de l'anticorps anti-HLA-A2 (clone BB7.1) dirigé contre la protéine d'intérêt HLA-A2.1 exprimée par nos CPAA a été vérifiée en cytométrie en flux sur des cellules NIH/3T3 et $CPAA^{A2.1}$ en utilisant un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorochrome FITC. Le contrôle négatif a été obtenu en utilisant des cellules NIH/3T3 n'exprimant pas HLA-A2.1, et le contrôle isotypique avec une IgG couplée au fluorochrome FITC qui nous a permis de placer la barre de positivité. Une forte expression de HLA A2 a été observée dans les $CPAA^{A2.1}$ (en rouge) et aucun marquage non spécifique de HLA-A2.1 n'a été détecté dans les NIH/3T3 (en bleu).

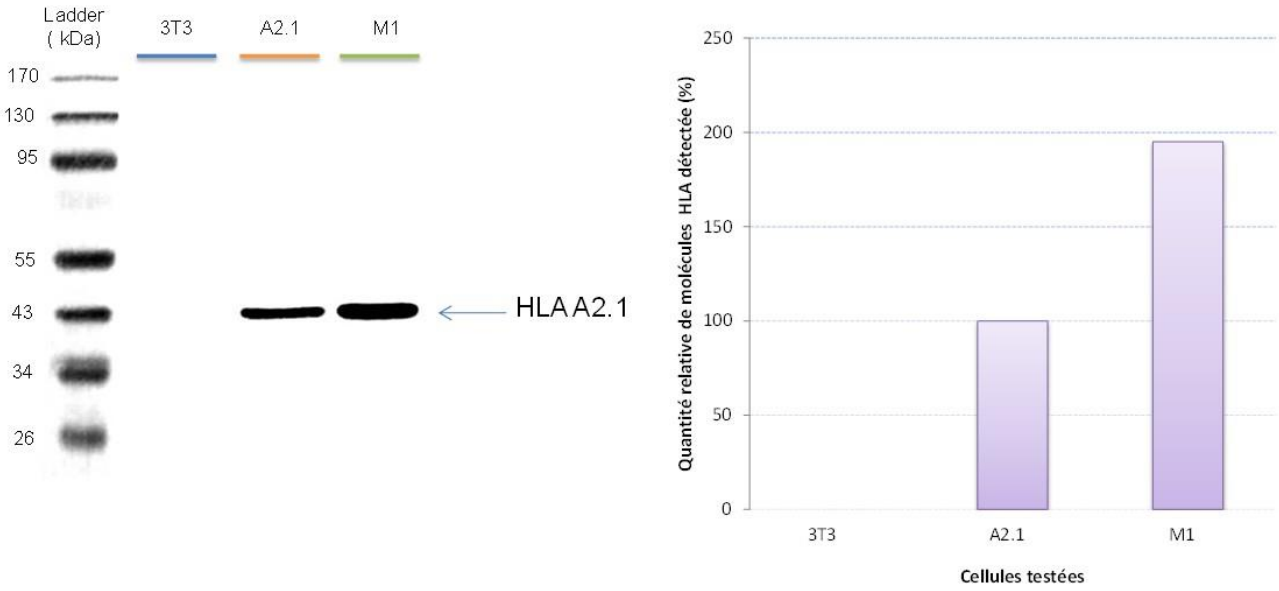


Figure 22 : Western Blot avec l'anticorps anti-HLA A, B et C dirigé contre les chaînes lourdes A, B et C des molécules HLA de classe I

Un Western Blot monodimensionnel (séparation des protéines selon leur poids moléculaire apparent) a été réalisé sur des cellules NIH/3T3 (3T3), CPAA$^{A2.1}$ (A2.1) et CPAA$^{A2.1/M1}$ (M1) avec l'anticorps anti-HLA-A, B et C dilué au 1000^{è} afin de détecter la protéine HLA-A2.1. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour les CPAA$^{A2.1}$. Le Western Blot a été réalisé dans des conditions dénaturantes réductrices avec dTT. Aucun signal non spécifique n'a été détecté dans les NIH/3T3. En revanche, la protéine HLA-A2.1 a été observée à un poids moléculaire apparent de 43 kDa dans les CPAA$^{A2.1}$ et CPAA$^{A2.1/M1}$. Cet anticorps a donc été utilisé par la suite pour valider l'efficacité de l'immunoprécipitation.

Les tampons présentant une faible concentration de détergent améliorent l'efficacité de l'immunoprécipitation en réduisant les liaisons non spécifiques. Dans le but de définir les conditions optimales d'immunoprécipitation des complexes HLA-A2.1-peptide, deux tampons immunoprécipitant avec différentes concentrations de détergent ont donc été testés : le tampon RIPA (1% NP40) et un second tampon préconisé par la société Abcam que nous appellerons tampon Abcam (0,1% de NP40) par la suite.

Les cellules NIH/3T3 et les CPAA$^{A2.1/M1}$ ont été utilisées pour mettre au point l'immunoprécipitation. Les NIH/3T3 ont été utilisées comme contrôle négatif. Les extraits protéiques bruts (500 µg) respectivement dérivés des NIH/3T3 et des CPAA$^{A2.1/M1}$ ont été

immunoprécipités avec 5µg d'anticorps. L'efficacité de l'immunoprécipitation a été vérifiée par Western Blot. Le Western Blot a été réalisé en condition dénaturante réductrice avec dTT sur l'extrait protéique brut, l'immunoprécipitat et le surnageant d'immunoprécipitation des NIH/3T3 et des $CPAA^{A2.1/M1}$.

Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut. Comme attendu, aucun signal n'a été observé dans l'extrait protéique brut, l'immunoprécipitat et le surnageant d'immunoprécipitation des NIH/3T3 quel que soit le tampon utilisé. Par contre, la protéine HLA a été détectée dans l'extrait brut, l'immunoprécipitat et le surnageant d'immunoprécipitation des $CPAA^{A2.1/M1}$ quel que soit le tampon utilisé. Le signal HLA-A2.1 était plus élevé dans l'immunoprécipitat obtenu avec le tampon RIPA (110,14%) que celui obtenu avec le tampon Abcam (60,50%, Figure 23). Toutefois, avec le tampon Abcam, une meilleure déplétion de l'extrait protéique brut (79,05%) a été observée par rapport au tampon RIPA (48%). Dans tous les immunoprécipats, avec les deux tampons, les chaînes lourdes (55kDa) et légères (25kDa) de l'anticorps anti-HLA-A2.1 ont été observées. Avec le tampon Abcam, l'anticorps anti-HLA-A2 présentait une bonne efficacité d'immunoprécipitation en fixant une quantité importante de molécules HLA provenant de l'échantillon brut. Ce tampon a été sélectionné pour les expériences d'immunoprécipitation suivantes parce qu'il a une forte capacité de déplétion de l'échantillon mais également parce qu'il présente une faible quantité de détergent. La différence d'intensité de signal observée dans les immunoprécipitats dérivés des deux tampons pourrait être due à un problème d'élution. La question concernant l'élution sera abordée ultérieurement.

Toujours afin d'optimiser les expériences d'immunoprécipitation, différentes concentrations d'extrait protéique (125 à 750 µg) de $CPAA^{A2.1/M1}$ ont été immunoprécipitées avec 5 µg d'anticorps afin de définir le meilleur ratio anticorps / extrait protéique permettant d'immunoprécipiter une quantité maximale de molécules HLA. La quantité de molécules HLA-A2.1 immunoprécipitée augmentait en fonction de la quantité de protéines initiale utilisée pour l'immunoprécipitation (Figure 24). La quantité de 750µg a donc été choisie pour réaliser les expériences suivantes.

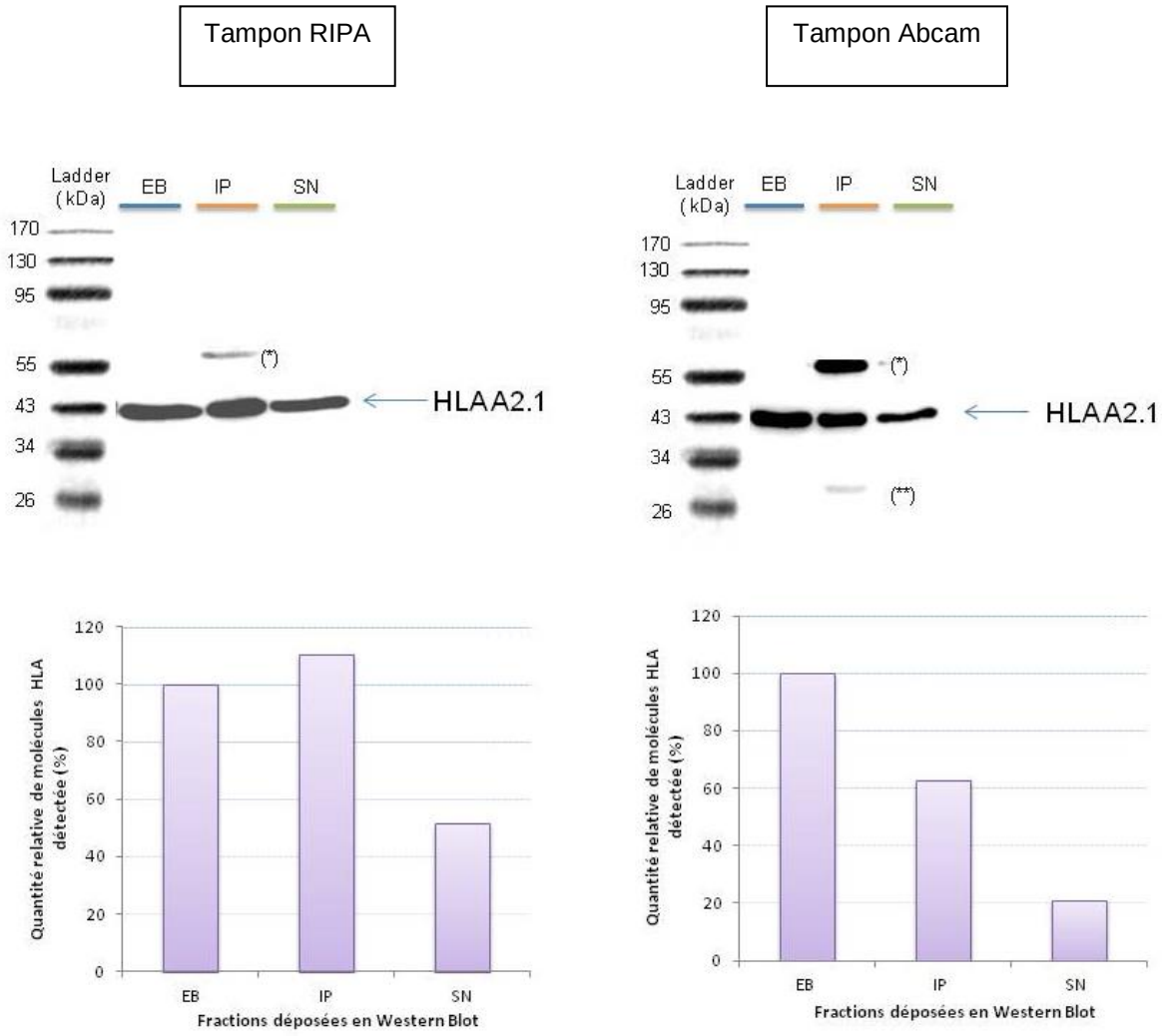


Figure 23 : Comparaison de l'efficacité des tampons RIPA et Abcam

Des extraits protéiques (500µg) obtenus à partir des cellules NIH/3T3 et des CPAA$^{A2.1/M1}$ ont été immunoprécipités avec 5µg d'anticorps anti-HLA-A2 en utilisant le tampon RIPA (1% de Nonidet-P40) ou un second tampon préconisé par Abcam (0,1% de Nonidet-P40). Les cellules NIH/3T3 ont été utilisées comme contrôle négatif. L'efficacité de l'immunoprécipitation a été vérifiée en Western Blot. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut (EB). L'EB et le surnageant d'immunoprécipitation (SN) ont été déposés à volume équivalent. Aucun signal n'a été observé dans les différents extraits dérivés des cellules NIH/3T3. La protéine HLA a été détectée dans l'extrait brut, l'immunoprécipitat (IP) et le surnageant d'immunoprécipitation des cellules CPAA$^{A2.1/M1}$ quelque soit le tampon utilisé. Le tampon Abcam a été sélectionné pour les expériences d'immunoprécipitation suivantes à cause de sa forte capacité de déplétion de l'échantillon avec une faible quantité de détergent.

* Chaîne lourdes de l'anticorps anti-HLA-A2

** Chaîne légères de l'anticorps anti-HLA -A2

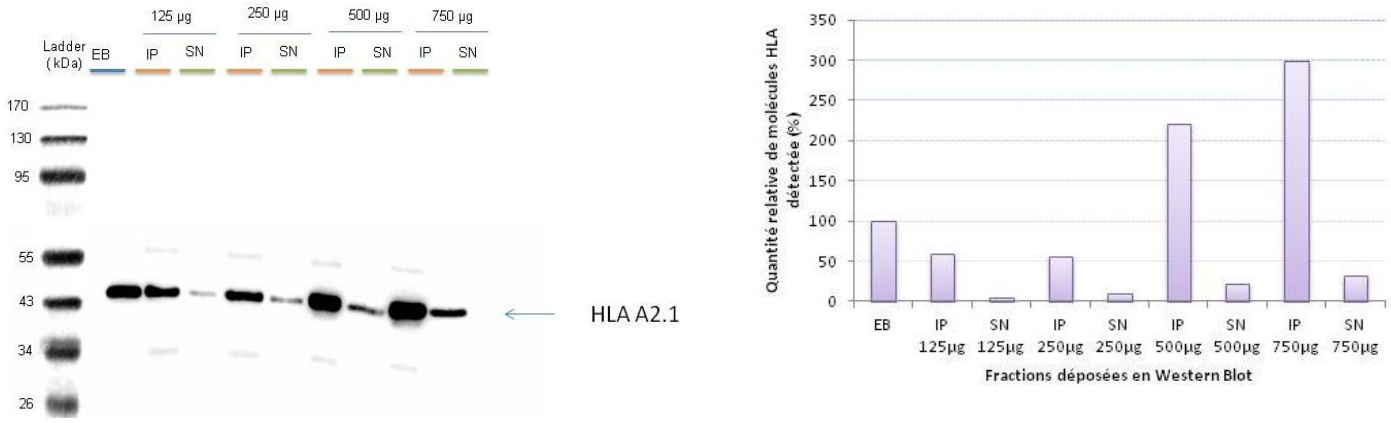


Figure 24 : Meilleur ratio anticorps/extrait protéique

Des concentrations croissantes d'extrait protéique (125 à 750 µg) de CPAA$^{A2.1/M1}$ ont été immunoprécipitées avec 5 µg d'anticorps afin de définir le meilleur ratio anticorps / extrait protéique permettant d'immunoprécipiter une quantité maximale de HLA. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut. L'extrait brut et les surnageants d'immunoprécipitations ont été déposés à volume équivalent. Une augmentation de la quantité de molécules HLA-A2.1 immunoprécipitées a été observée en fonction de la quantité de protéine initiale utilisée. La quantité de 750µg a donc été choisie pour réaliser les expériences suivantes. EB = Extrait Brut ; IP = Immunopécipitat ; SN = surnageant d'immunoprécipitation.

Une immunoprécipitation a été réalisée sur des CPAA$^{A2.1/M1}$ pour évaluer si une seule élution en tampon de charge était suffisante pour récupérer tous les complexes HLA-A.2.1-peptide d'intérêt. A la fin de l'immunoprécipitation, une étape d'élution en tampon de charge a été effectuée, et ensuite les billes restantes ont été reprises dans du tampon de charge et analysées en Western Blot. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut. La protéine HLA a été retrouvée dans l'extrait brut, l'immunoprécipitat, le surnageant d'immunoprécipitation, mais également à partir des billes restantes après immunoprécipitation. L'efficacité de déplétion a été de l'ordre de 79 % et une meilleure récupération de HLA-A2.1 a été observée dans l'immunoprécipitat (340 %). La présence de la protéine HLA avec les billes restantes (25%) après immunoprécipitation montre qu'une seule élution en tampon de charge est insuffisante pour récupérer tous les complexes HLA-A2.1 immunoprécipités (Figure 25). Plusieurs élutions ont donc été envisagées afin d'éluer tous les complexes HLA-peptide.

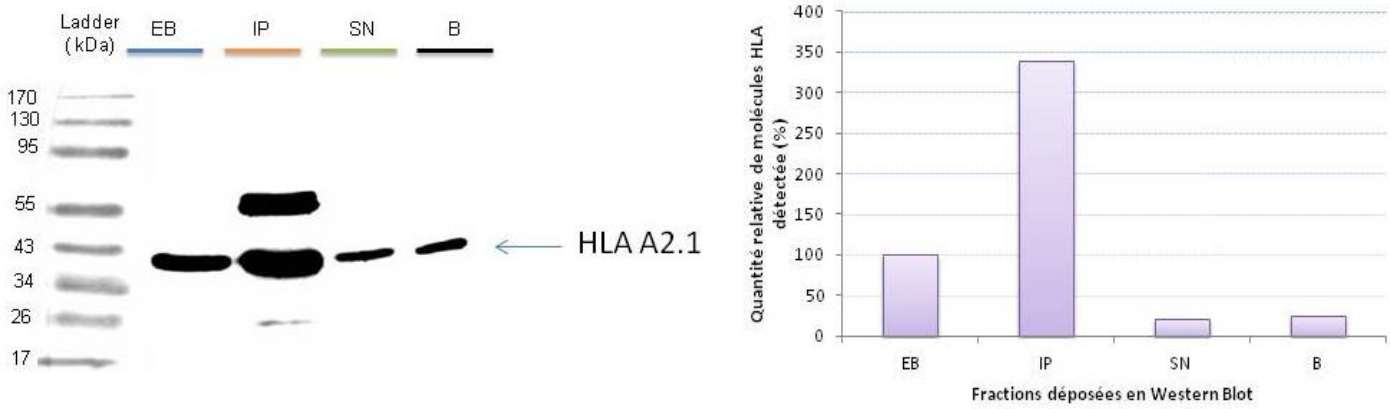


Figure 25 : Capacité d'élution du tampon de charge

Une étape d'élution en tampon de charge a été effectuée après une immunoprécipitation des complexes HLA-A2.1–peptide des CPAA$^{A2.1/M1}$ et les billes restantes ont été reprises dans du tampon de charge et analysées en Western Blot. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut. L'extrait brut (EB) et le surnageant d'immunoprécipitation (SN) ont été déposés à volume équivalent. La protéine HLA a été retrouvée dans l'extrait brut, l'immunoprécipitat (IP), le surnageant d'immunoprécipitation des cellules, mais également à partir des billes restantes (B) après immunoprécipitation.

Enfin, deux procédures d'immunoprécipitation ont été testées en utilisant des CPAA$^{A2.1/M1}$, afin de déterminer laquelle de ces deux procédures permettrait d'obtenir le meilleur rendement HLA-A2.1 après immunoprécipitation. Dans la procédure A, l'extrait protéique a été incubé avec l'anticorps anti-HLA-A2 puis les billes de sépharose ont été ajoutées. Dans la procédure B, les billes de sépharose ont été incubées avec l'anticorps anti-HLA-A2 puis l'extrait protéique a été ajouté. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut. Le signal HLA obtenu dans l'immunoprécipitat avec la procédure A (433%) était supérieur au signal obtenu dans l'immunoprécipitat avec la procédure B (375%). En revanche, une meilleure déplétion de l'échantillon brut a été observée avec la procédure B (90%) qu'avec la procédure A (84%). La différence entre les signaux observés avec les procédures A et B provient certainement de l'élution puisqu'il a été démontré précédemment qu'une seule élution était insuffisante pour obtenir tous les complexes HLA-peptide. Les deux procédures ne présentant pas de grande différence de rendement, la procédure B a donc été choisie pour les expériences d'immunoprécipitation

parce qu'elle permet une réduction des temps d'incubation et surtout une meilleure préservation des interactions protéine-protéine (Figure 26).

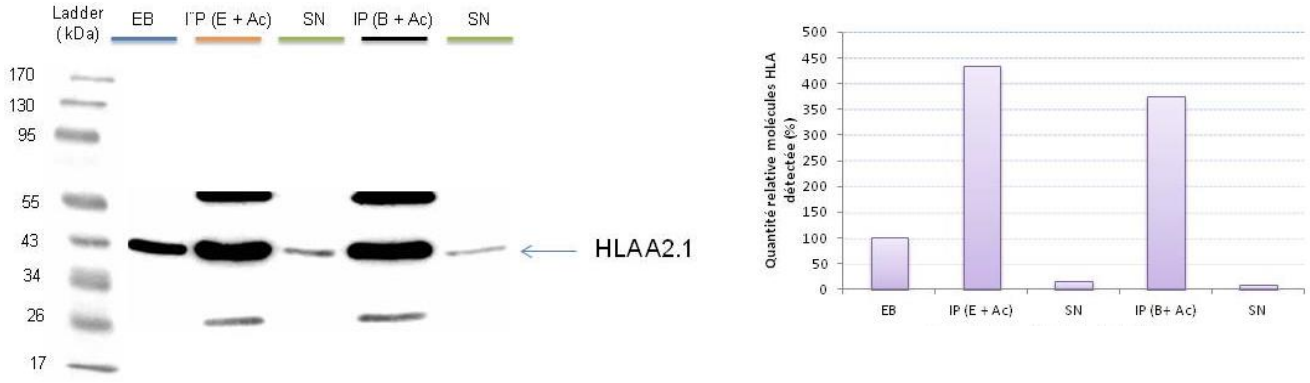


Figure 26 : Choix de la procédure d'immunoprécipitation

Deux procédures d'immunoprécipitation ont été testées en utilisant des $CPAA^{A2.1/M1}$: la procédure A qui consiste à incuber l'extrait protéique brut avec l'anticorps anti-HLA-A2 puis à ajouter les billes de sépharose et la procédure B qui consiste à incuber les billes de sépharose avec l'anticorps anti-HLA-A2 puis à ajouter l'extrait protéique. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut. L'extrait brut (EB) et le surnageant d'immunoprécipitation (SN) ont été déposés à volume équivalent. Le signal de HLA obtenu dans l'immunoprécipitat (IP (E+Ac)) avec la procédure A est supérieur au signal obtenu dans l'immunoprécipitat (IP (B+Ac)) avec la procédure B.

Pour une analyse par spectrométrie de masse, l'élution doit s'effectuer avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% compatible avec ce type d'analyse. Une immunoprécipitation a été réalisée sur des $CPAA^{A2.1/M1}$ pour évaluer la capacité d'élution du TFA. A la fin de l'immunoprécipitation, deux élutions ont été effectuées avec le TFA, et ensuite les billes restantes ont été reprises dans du TFA et analysées par Western Blot. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut. La protéine HLA a été détectée dans l'extrait brut, l'immunoprécipitat (première élution : 237%, et deuxième élution : 188%), le surnageant d'immunoprécipitation des $CPAA^{A2.1/M1}$, mais également à partir des billes restantes (278%) après immunoprécipitation. Le signal élevé de la protéine HLA avec les billes restantes après immunoprécipitation montre que les deux élutions effectuées étaient insuffisantes pour récupérer tous les complexes HLA-A2.1 immunoprécipités (Figure 27). Huit élutions ont donc été réalisées par la suite afin d'éluer la quasi-totalité des complexes

HLA-peptide. De plus, d'autres expériences d'optimisation d'élution que nous avons réalisées ont montré que le rendement après élution en TFA était considérablement amélioré en agitant pendant 15 min ou 1h l'échantillon avant élution (résultats non montrés). Par la suite, les échantillons ont donc été agités avec le TFA pendant 15 min avant chaque élution. Les conditions d'immunoprécipitation étant à présent réunies, des échantillons à analyser en spectrométrie ont été préparés.

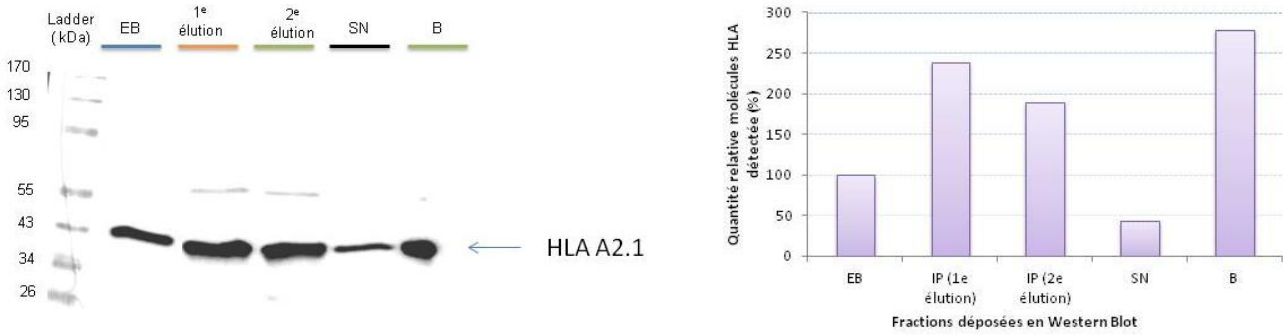


Figure 27 : Capacité d'élution de l'acide trifluoroacétique (TFA)

Une immunoprécipitation a été réalisé sur des $CPAA^{A2.1/M1}$ puis deux élutions ont été effectuées avec le TFA. Les billes restantes (B) ont été reprises dans du TFA et analysées en Western Blot. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut. L'extrait brut (EB) et le surnageant d'immunoprécipitation (SN) ont été déposés à volume équivalent. La protéine HLA a été détectée dans l'extrait brut, l'immunoprécipitat (première élution (IP 1e élution) ; et deuxième élution (IP 2e élution)), le surnageant d'immunoprécipitation (SN) mais également à partir des billes restantes après immunoprécipitation.

Avant l'analyse des échantillons par spectrométrie de masse, il nous a fallu évaluer le seuil de détection des peptides purs M1 et FSP02 par spectrométrie de masse. Pour cela, des quantités croissantes (25, 50 et 100 fmol) de peptides M1 et FSP02 ont été analysées. L'intensité du signal ainsi obtenu était proportionnelle à la quantité de peptide injecté, mais une quantité minimale de 25 fmol était suffisante pour détecter les 2 peptides, permettant de fixer à cette valeur le seuil de détection minimal de ces deux peptides (Figure 28) sur le système LC-QTOF. Le peptide M1 a été retrouvé uniquement sous une forme mono-chargée (ions m/z 814.50 (1+)). En revanche, le peptide FSP02 a été retrouvé sous une forme majoritairement di-chargée (ion m/z 466.25 (2+)) et sous une forme minoritaire mono-chargée (ion m/z 931.50 (1+)). Les ions 814.50 (1+) et 466.25 (2+) ont été séquencés, ce qui a permis

de retrouver respectivement les séquences du peptide M1 (AAGIGILTV) et du peptide FSP02 (RLSSCVPVA). Les séquences en acides aminés de ces deux peptides sont donc bien caractérisables par spectrométrie de masse (Figure 29).

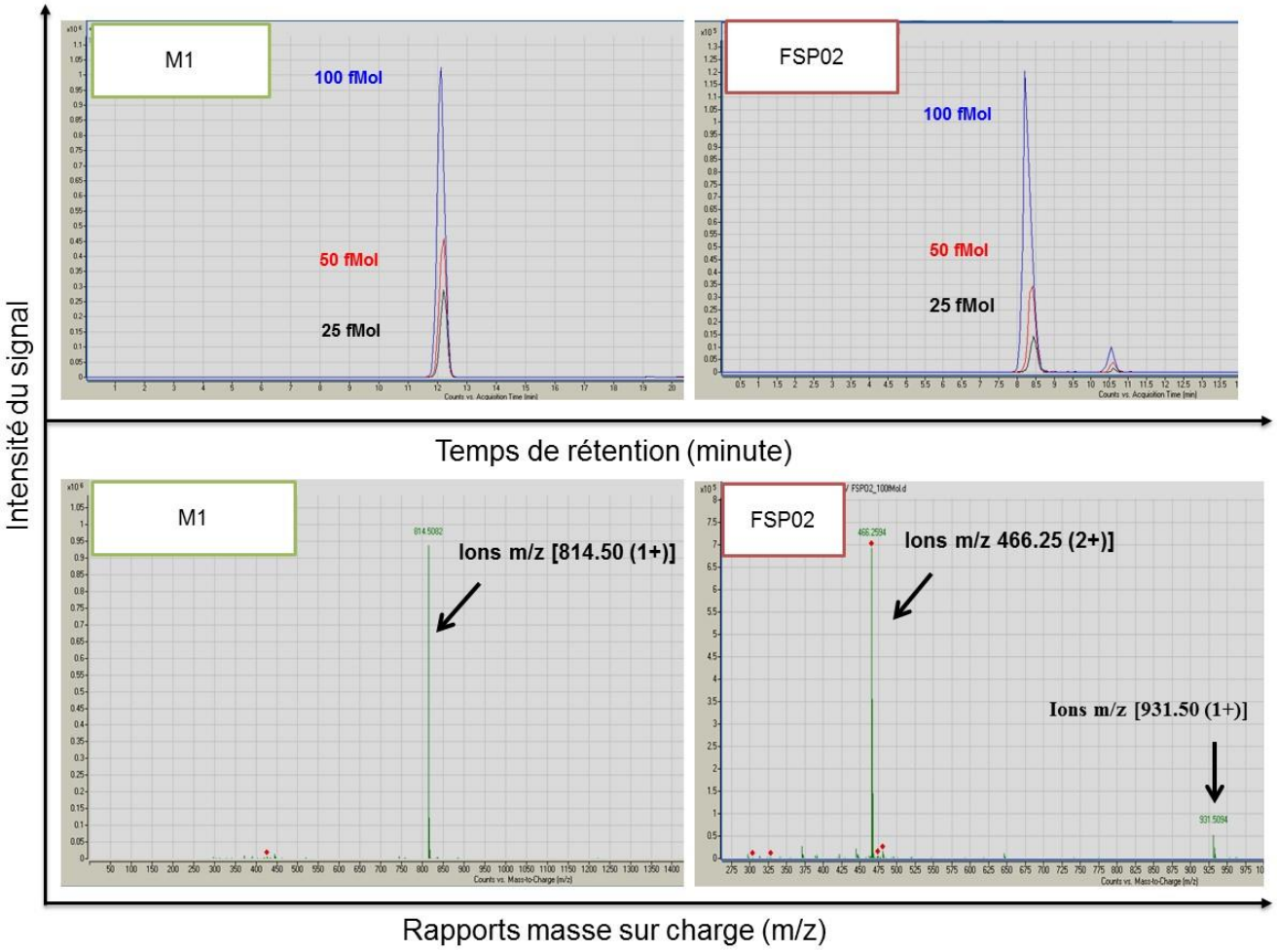


Figure 28 : Evaluation du seuil de détection des peptides FSP02 et M1 par spectrométrie de masse

Des quantités croissantes (25, 50 et 100 fmol) de peptides FSP02 et M1 ont été analysées. L'intensité du signal obtenu était proportionnelle à la quantité de peptide injecté mais une quantité minimale de 25fmol a été suffisante pour détecter les 2 peptides sur le système LC-QTOF. Le peptide FSP02 a été retrouvé sous une forme majoritairement di-chargée (ion m/z [466.25 (2+)]) et sous une forme minoritaire mono-chargée (ion m/z [931.50 (1+)]). Le peptide M1 a été retrouvé uniquement sous une forme mono-chargée (ions m/z [814.50 (1+)]).

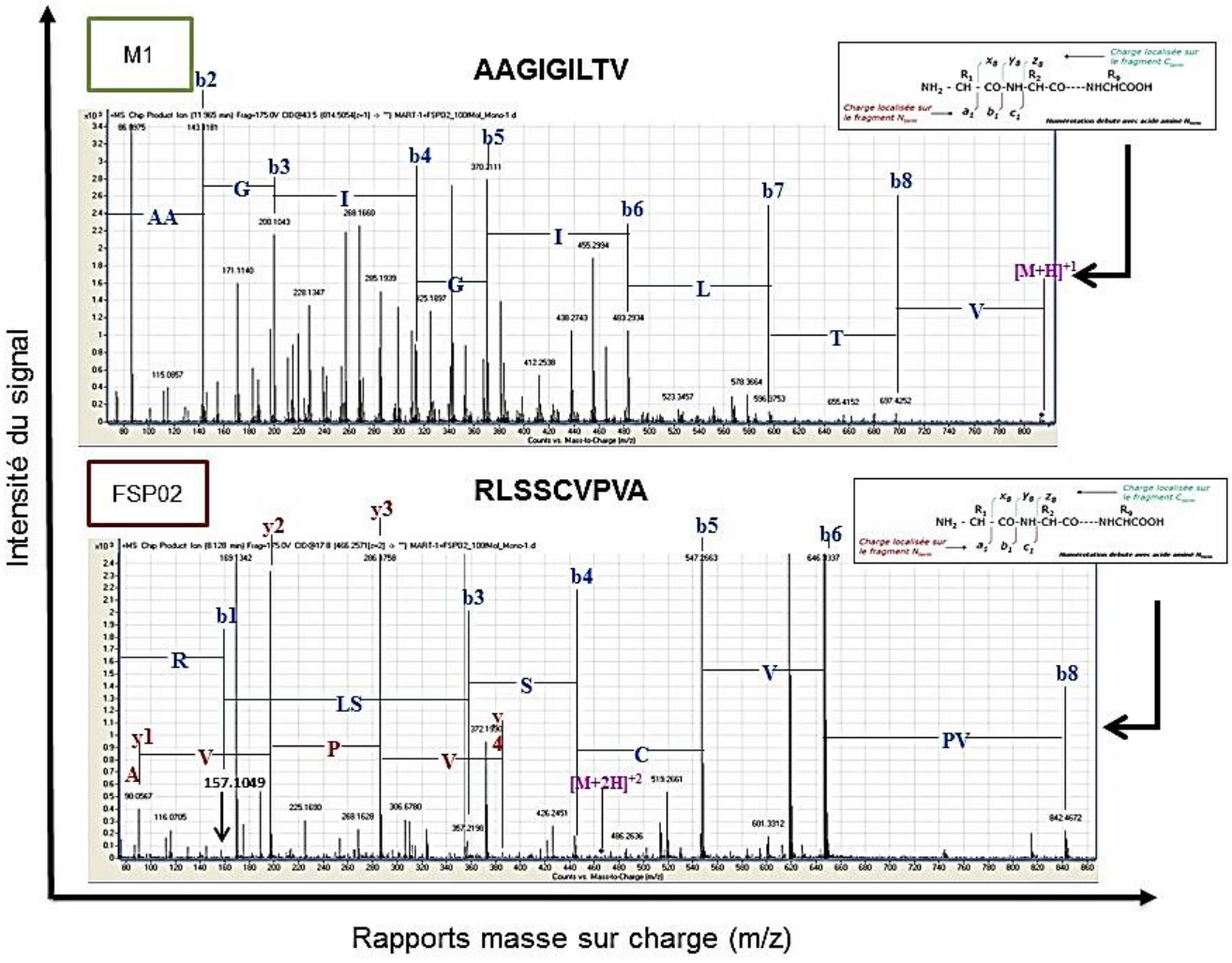


Figure 29 : Identification des peptides M1 et FSP02 : séquençage des ions 814.50 (1+) et 466.25 (2+).

Les ions 814.50 (1+) et 466.25 (2+) ont été séquencés, ce qui a permis de confirmer respectivement la séquence du peptide M1 (AAGIGILTV) et la séquence du peptide FSP02 (RLSSCVPVA).

Avant l'analyse des échantillons par spectrométrie de masse, une dernière étape d'ultrafiltration est nécessaire pour s'affranchir des molécules HLA et des chaînes lourdes et légères de l'anticorps. Afin de déterminer l'effet de l'ultrafiltration sur les peptides M1 et FSP02, des quantités croissantes de ces peptides (25, 50 et 100 fmol) ont été analysées par spectrométrie de masse avant et après passage sur filtre Amicon ultracel YM-10. Ainsi, après ultrafiltration, une perte moyenne inférieure à 10 % a été observée pour le peptide FSP02. Cependant, pour le peptide M1, la perte moyenne a été évaluée à 58%. La perte après ultrafiltration a donc été variable d'un peptide à l'autre (Figure 30). Néanmoins, malgré la perte, il reste une quantité suffisante des peptides, pour permettre leur détection par spectrométrie de masse.

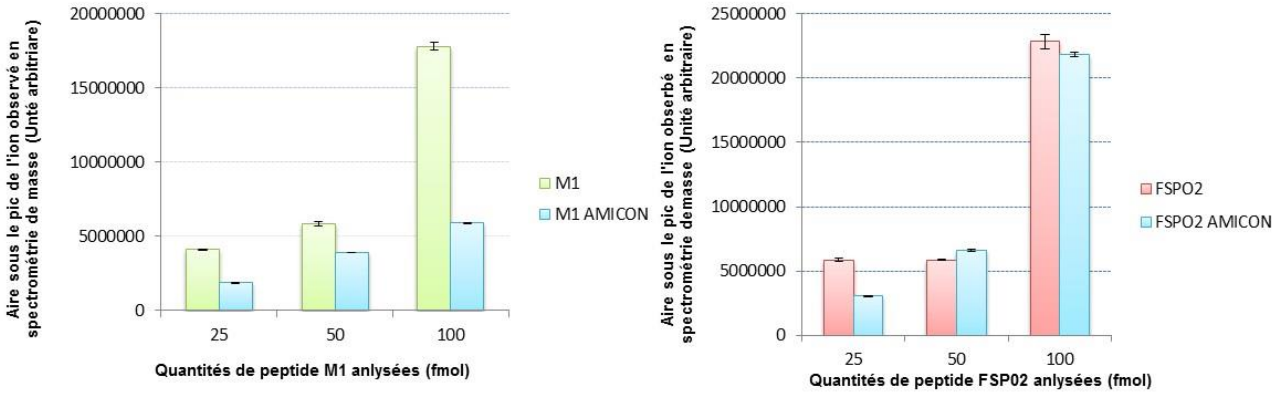


Figure 30 : Evaluation de la perte des peptides M1 et FSP02 après passage sur filtre Amicon ultracel YM-10

La moitié de l'éluat obtenu après immunoprécipitation de 750 µg d'extrait protéique issu des cellules NIH/3T3, $CPAA^{A2.1}$, $CPAA^{A2.1/M1}$ et $CPAA^{A2.1/FSP02}$ a été enrichie en peptides par une étape d'ultrafiltration. Les filtrats ont été entièrement évaporés au « speedvac », repris dans 20 µL d'ACN 3% AF 0,1 % et 1 µL de chaque immunoprécipitat a été analysé par nano LC-ESI-QTOF. Un mélange de 100 fmol des peptides FSP02 et M1 a été injecté pour servir de contrôle positif. Après analyse, les ions 814.50 (1+) et 466.25 (2+) ont été respectivement observés dans le contrôle positif à un temps de rétention de 14,103 minutes avec une intensité de 4,5 x 10^5, et à un temps de rétention de 9,384 minutes avec une intensité de 2,75 x 10^5. Sur les spectres des immunoprécipitats des cellules NIH/3T3, $CPAA^{A2.1}$, $CPAA^{A2.1/M1}$ et $CPAA^{A2.1/FSP02}$, en prenant en compte les différentes masses mono-isotopiques obtenues, un profil général correspondant à des peptides a été observé. Toutefois, les ions 814.50 (1+) et 466.25 (2+) correspondant respectivement aux peptides M1 et FSP02, n'ont pas été observés dans les immunoprécipitats respectifs des $CPAA^{A2.1/M1}$ et $CPAA^{A2.1/FSP02}$ (Figure 31). Cela pourrait être dû à la présence d'une faible quantité des peptides M1 et FSP02, inférieure au seuil de détection défini ci-dessus. Pour les expériences suivantes, nous nous sommes focalisés sur le peptide M1, afin d'effectuer rapidement les différentes mises au point permettant de résoudre les problèmes de détection des peptides par spectrométrie de masse.

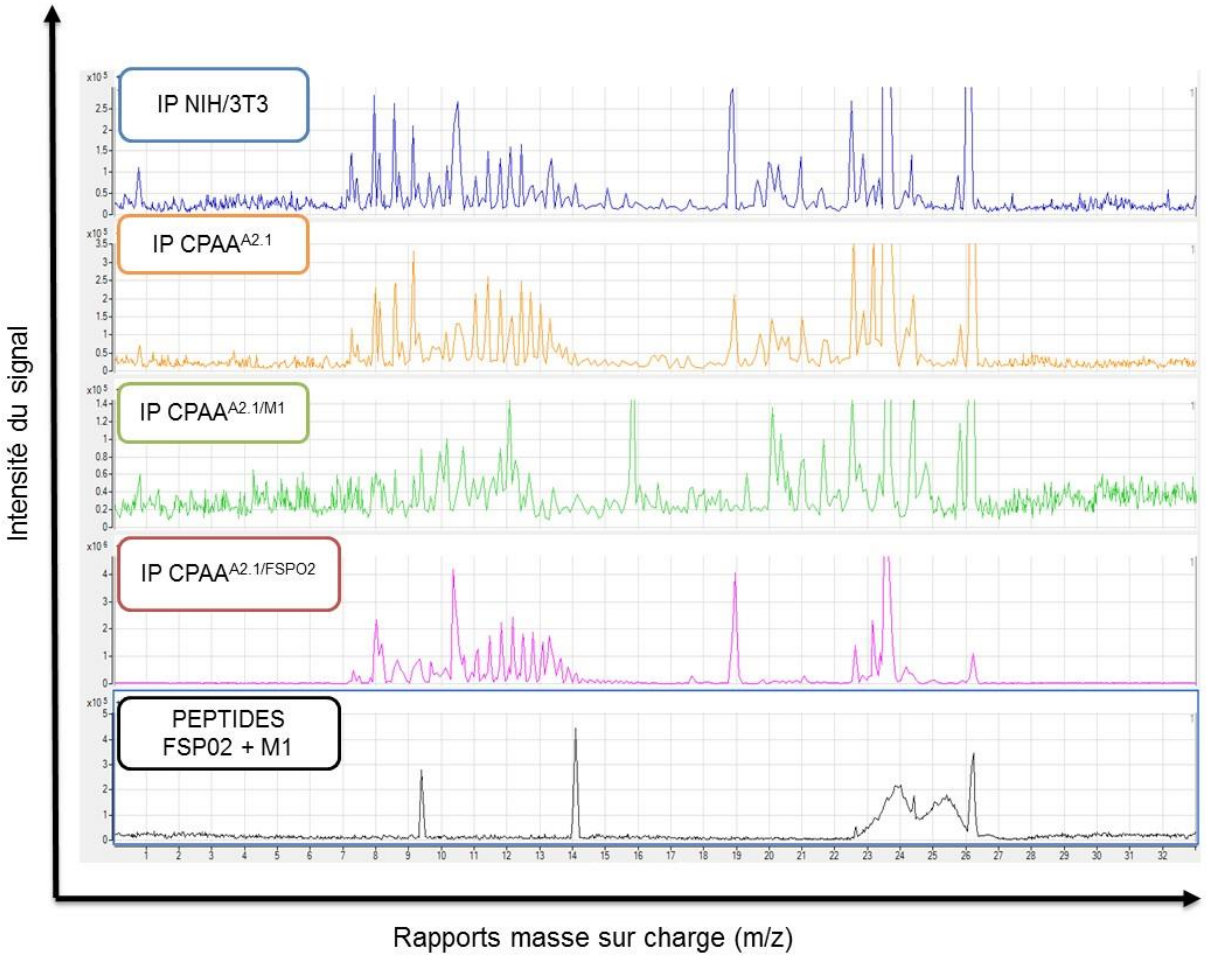


Figure 31 : Première analyse des immunoprécipitats des CPAA$^{A2.1/M1}$ et des CPAA$^{A2.1/FSP02}$ par LC-Q-TOF
La moitié de l'éluat obtenu après immunoprécipitation de 750µg d'extrait protéique issu des cellules NIH/3T3, CPAA$^{A2.1}$, CPAA$^{A2.1/M1}$ et CPAA$^{A2.1/FSP02}$ a été enrichi en peptides par une étape d'ultrafiltration et 1µL de chaque immunoprécipitat a été analysé par nano LC-ESI-Q-TOF. Un mélange de 100 fmol des peptides FSP02 et M1 a été injecté pour servir de contrôle positif. Les ions 814.50 (1+) et 466.25 (2+) correspondant respectivement aux peptides M1 et FSP02 n'ont pas été observés dans les immunoprécipitats respectifs des CPAA$^{A2.1/M1}$ et CPAA$^{A2.1/FSP02}$.

Pour savoir si la non détection de M1 était liée à la faible quantité analysée, après concentration, une quantité 10 fois plus importante des immunoprécipitats des CPAA$^{A2.1}$ et CPAA$^{A2.1/M1}$ a été analysée. Les signaux obtenus étaient 10 fois plus élevés que ceux obtenus précédemment, mais le peptide M1 n'était toujours pas détecté. En revanche, l'augmentation de la quantité d'immunoprécipitat analysé a entraîné également une augmentation importante du bruit de fond, en particulier, des polymères ont été observés entre 24 et 27 minutes (figure 32). La présence de quantité importante de ces polymères pourrait contribuer à masquer le

signal spécifique du peptide M1 par « suppression de signal », phénomène bien connu en spectrométrie de masse. L'étape d'enrichissement en peptide d'intérêt a donc dû encore être optimisée pour obtenir un meilleur rapport signal sur bruit de fond. C'est la raison pour laquelle une méthode alternative d'enrichissement en peptide d'intérêt a été évaluée.

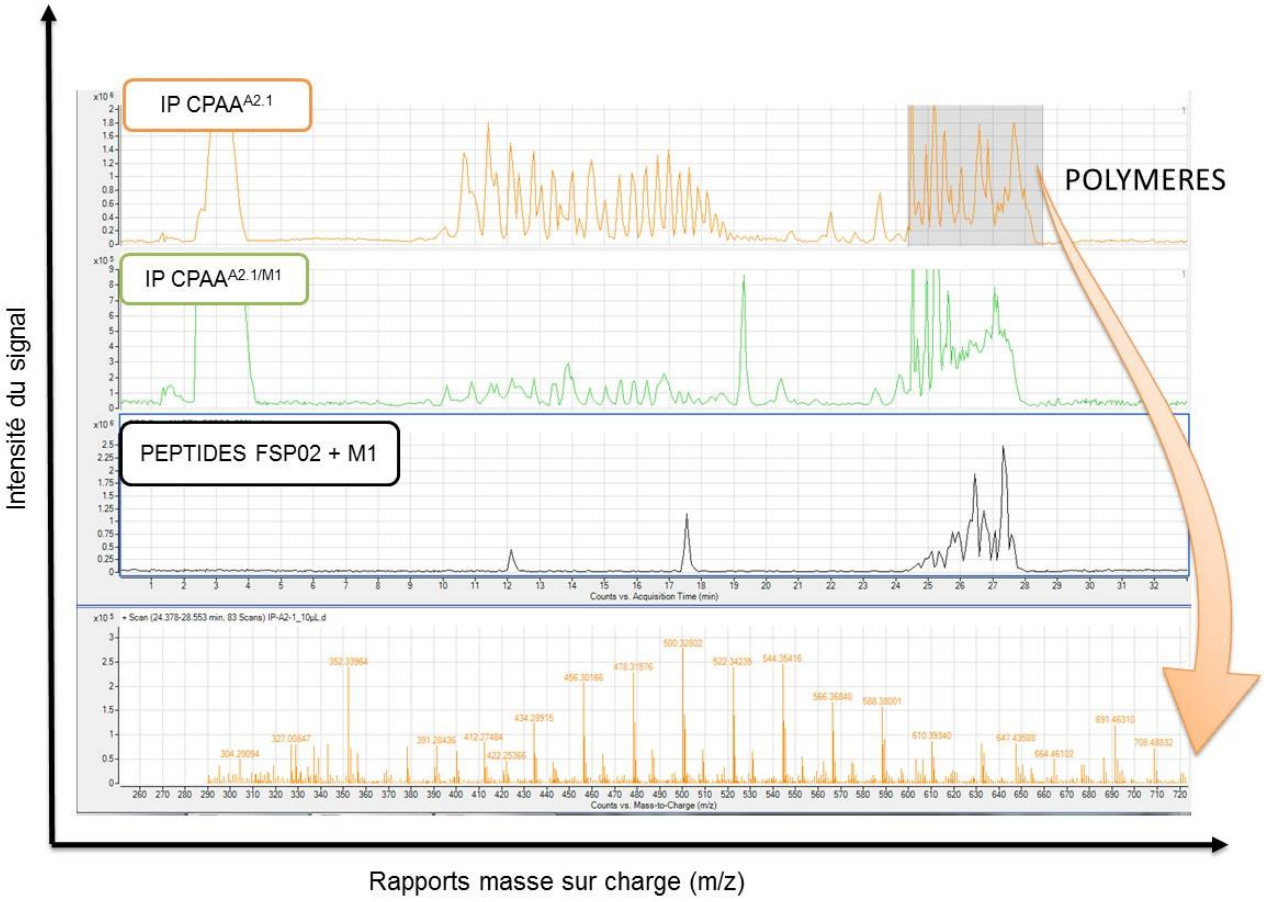


Figure 32 : Analyse d'une quantité plus importante des immunoprécipitats des CPAA$^{A2.1/M1}$ par LC Q TOF

Après concentration, une quantité 10 fois plus importante des immunoprécipitats des CPAA$^{A2.1}$ et CPAA$^{A2.1/M1}$ a été analysée. Les signaux obtenus sont 10 fois plus élevés que ceux obtenus précédemment mais cela entraîne également une augmentation importante du bruit de fond en particulier des polymères observés entre 24 et 27 minutes.

Le pourcentage de perte du peptide pur M1 a été évalué après passage sur une colonne « tips » Omix C18. Une meilleure récupération du peptide M1 a été observée (76 %) avec la colonne « tips » Omix C18 (sans lavage ou après 5 lavages de la colonne avant élution) par rapport au résultat obtenu précédemment avec le filtre Amicon (42%). L'enrichissement des immunoprécipitats en peptide serait donc meilleur en utilisant une colonne « tips » Omix C18

pour les CPAA$^{A2.1/M1}$ (Figure 33, histogramme de gauche). L'efficacité de la colonne « tips » Omix a été également évaluée pour le peptide FSP02, mais une perte plus importante de FSP02 (31% sans lavage de la colonne et 46% après 5 lavages de la colonne avant élution) a été observée par rapport au résultat obtenu avec le système Amicon (8%). Pour les immunoprécipitats des CPAA$^{A2.1/SP02}$, l'enrichissement en peptide serait donc meilleur en utilisant le filtre Amicon ultracel YM-10 plutôt que la colonne « tips » Omix C18 (Figure 33, histogramme de droite).

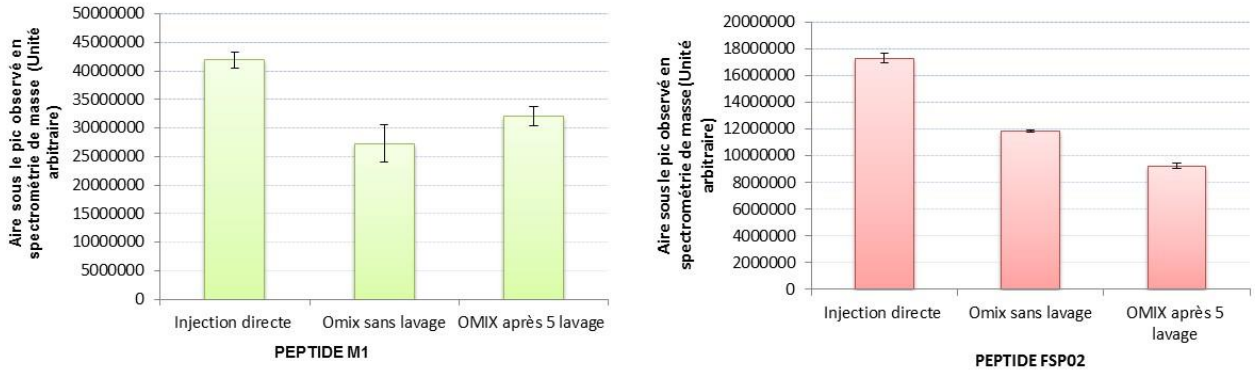


Figure 33 : Evaluation de la perte lors d'enrichissement par colonne « tips » OMIX C18

Le pourcentage de perte du peptide pur M1 (histogramme de gauche) et FSP02 (histogramme de droite) a été évalué après passage sur une colonne **« tips »** OMIX C18. Une meilleur récupération de M1 et une perte plus importante de FSP02 a été observée avec cette colonne (sans ou après 5 lavage de la colonne avant élution) par rapport au résultat obtenu précédemment avec le filtre.

Un immunoprécipitat des CPAA$^{A2.1/M1}$ a donc été enrichi cette en peptide fois-ci, sur colonne « tips » OMIX C18, et les peptides ont été élués à 40 % d'ACN, un pourcentage permettant théoriquement de ne pas éluer les polymères contaminants. Après analyse, les polymères contribuant à masquer le signal ont été bien retenus dans la colonne et n'apparaissaient donc plus dans les spectres. Une amélioration de la qualité des spectres a été obtenue, et le pic 814.50 (1+) présentant le bon rapport masse sur charge (m/z), correspondant au peptide M1, a été détecté. Bien que le rapport m/z et le temps de rétention de l'ion monochargé nous aient bien permis de confirmer la présence du peptide M1 dans l'immunoprécipitat analysé, la quantité de l'ion était insuffisante pour permettre son séquençage (Figure 34).

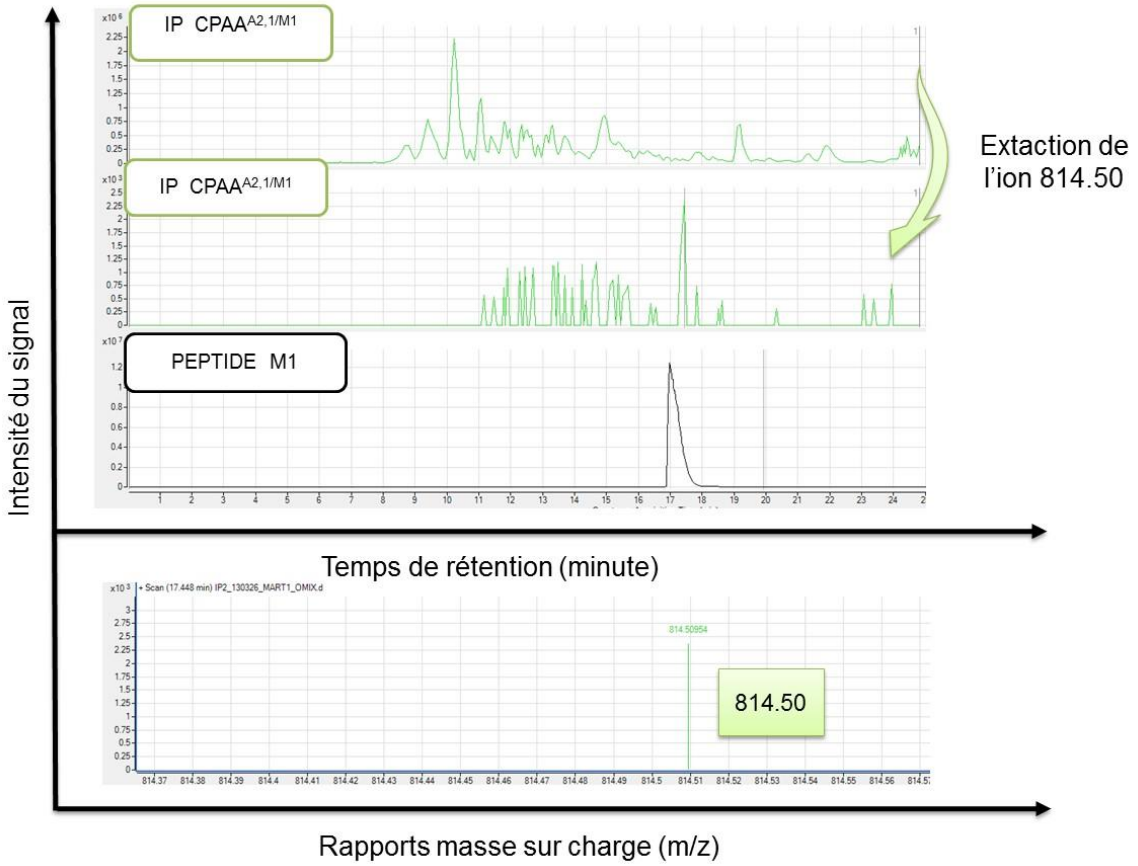


Figure 34 : Détection du peptide M1 par LC-QTOF

Un immunoprécipitat des CPAA$^{A2.1/M1}$ a été enrichi en peptides sur colonne « tips » Omix C18, et les peptides ont été élués à 40 % d'ACN. Les polymères contribuant à masquer le signal ont été retenus dans la colonne et n'apparaissent donc plus dans les spectres. Après analyse, le pic 814.50 (1+) correspondant au peptide M1 a été observé.

Une analyse sur le système LC-Triple Quad nous a permis de faire un dosage précis de la quantité de peptide M1 (Figure 35) dans l'immunoprécipitat des CPAA$^{A2.1/M1}$. La quantité de peptide M1 (310 amol/µL), dans l'immunoprécipitat, était bien inférieure au seuil de détection du Q-TOF (25 fmol/µL). Ces résultats nous ont donc laissé penser que, après de nouvelles mises au point permettant l'augmentation de la quantité des peptides élués, la caractérisation de néopeptides inconnus issus de néoantigènes tumoraux serait réalisable.

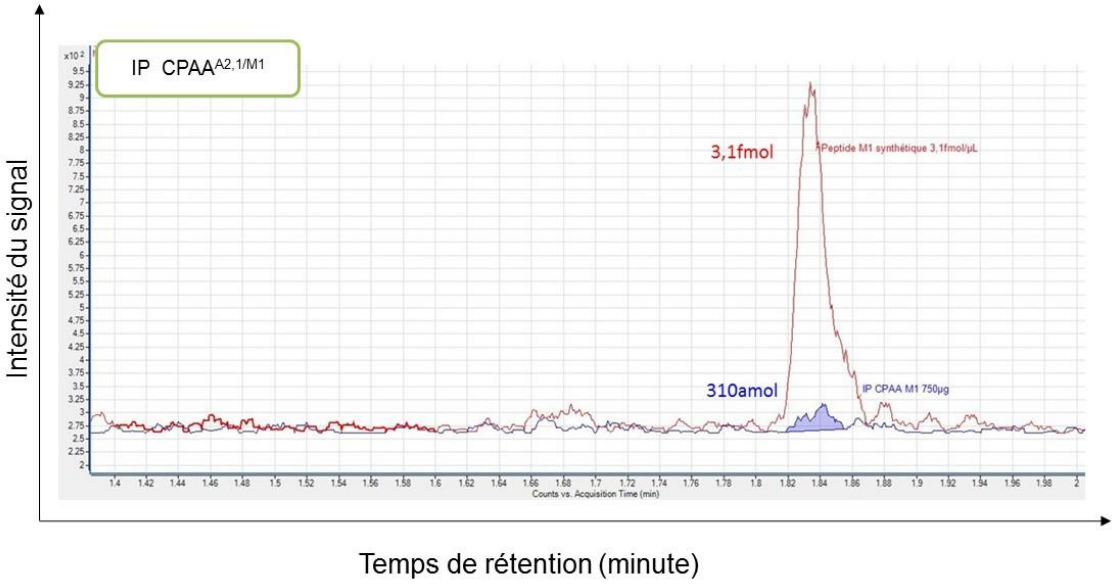


Figure 35 : Dosage du peptide M1 par analyse des immunoprécipitats sur le système LC-Triple Quad
Un immunoprécipitat des CPAA$^{A2.1/M1}$ a été analysé sur le système LC-Triple Quad. Le peptide M1 est concentré à 310amol/µL dans nos échantillons enrichis et nettoyés, ce qui est très inférieur au seuil de détection du Q-ToF (25fmol/µL).

Après des échanges très fructueux avec le Pr Stefan Stevanovic et le Dr Markus Schirle, spécialistes mondiaux de l'étude de peptides HLA-restreints, des étapes d'optimisation ont été envisagées afin d'augmenter l'intensité du signal déjà détecté. Des améliorations ont donc été apportées au niveau des étapes clés du protocole, notamment les étapes de solubilisation des complexes HLA-A2.1 et d'immunoprécipitation, afin de réduire les phénomènes de suppression de signal générés par les solvants ou tampons utilisés lors de ces étapes.

Pour les nouvelles mises au point, nous avons utilisé du CHAPS pour la solubilisation des complexes HLA-A2.1. Le CHAPS est un détergent zwitterionique, soluble dans une large gamme de pH (2-12), qui protège l'état natif des protéines. Il est utile pour la solubilisation des protéines membranaires, mais surtout le CHAPS résiduel n'interfère pas avec l'analyse par spectrométrie de masse autant que les autres détergents comme le SDS ou le NP40 présents dans les tampons RIPA ou Abcam utilisés précédemment.

Une augmentation de la quantité de protéines de départ pour les expériences d'immunoprécipitation nécessite également une augmentation de la quantité d'anticorps. Pour cela, nous avons donc purifié l'anticorps anti-HLA-A2 à partir de l'hybridome HB-82 (clone BB7.2). Après purification, la qualité de l'anticorps anti-HLA-A2 purifié dirigé contre la protéine d'intérêt HLA-A2.1 exprimée par nos CPAA, a été évaluée par cytométrie en flux sur des CPAA$^{A2.1/M1}$ en utilisant un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorochrome PE. Le contrôle négatif a été obtenu en utilisant des cellules NIH/3T3 n'exprimant pas la molécule HLA-A2.1. Une forte expression de HLA-A2.1 (100%) a été observée dans les CPAA$^{A2.1/M1}$ et aucun marquage non spécifique n'a été détecté sur les cellules NIH/3T3. L'anticorps anti-HLA-A2 purifié à partir de l'hybridome HB-82 reconnaît donc bien spécifiquement la molécule HLA-A2 en cytométrie en flux (données non présentées).

Afin d'optimiser les nouvelles expériences d'immunoprécipitation, 1mg d'extrait protéique des CPAA$^{A2.1/M1}$ a été immunoprécipité avec 5 µg d'anticorps afin de valider l'anticorps anti-HLA-A2.1 purifié pour les expériences d'immunoprécipitation. L'anticorps purifié permet d'immunoprécipiter efficacement la protéine HLA-A2.1 (Figure 36).

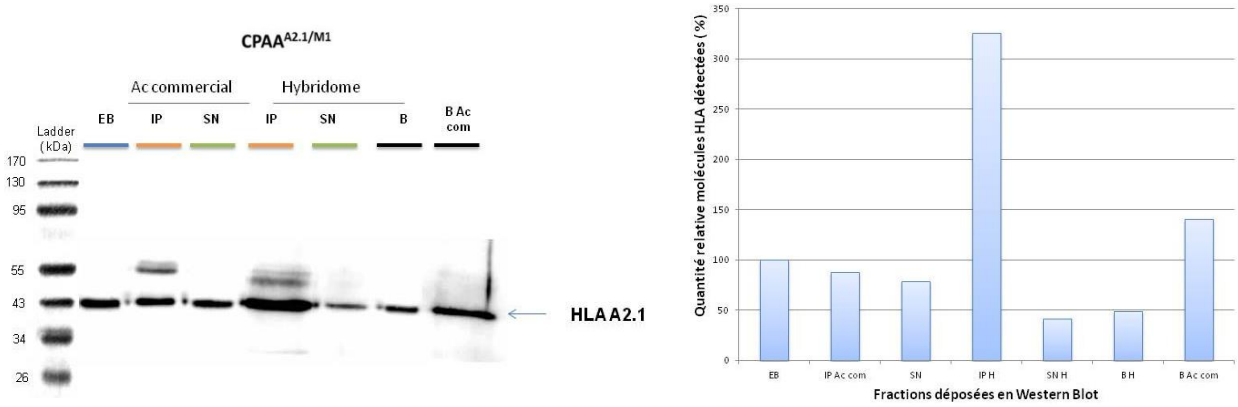


Figure 36 : Validation de l'anticorps purifié pour l'immunoprécipitation des complexes HLA-A2.1

Des extraits protéiques (1 mg) obtenus à partir des CPAA$^{A2.1/M1}$ ont été immunoprécipités avec 5µg d'anticorps anti-HLA-A2 commercial ou purifié à partir de l'hybridome HB82. L'efficacité de l'immunoprécipitation a été vérifiée en Western Blot. Les résultats ont été exprimés en quantité relative de molécules HLA par rapport à la quantité obtenue en fixant une valeur de 100% pour l'extrait protéique brut (EB). L'EB et le surnageant d'immunoprécipitation (SN) ont été déposés à volume équivalent. La protéine HLA a été détectée dans l'extrait brut, l'immunoprécipitat (IP) et le surnageant d'immunoprécipitation des cellules CPAA$^{A2.1/M1}$ quelque soit l'anticorps utilisé. L'anticorps purifié permet d'immunoprécipiter la protéine HLA-A2.1, de façon plus efficace que l'anticorps commercial.

Toujours dans le but d'optimiser les nouvelles expériences d'immunoprécipitation, l'anticorps purifié a été couplé de manière covalente aux billes de sépharose. En effet, la fixation non covalente de l'anticorps peut engendrer des pertes des complexes HLA-A2.1-peptide notamment lors des étapes de lavage. De plus, malgré le fait que l'étape de filtration permet d'éliminer les composants de masse moléculaire élevés, l'extrait peptidique pourrait être contaminé par des composants de petites masse moléculaire dérivés de l'anticorps non fixé de manière non covalente. Des étapes de mises au point, ont été effectuées pour définir les meilleurs conditions d'immobilisation de l'anticorps anti-HLA-A2 sur les billes de sépharose (données non présentées).

Suite à toutes ces optimisations, des nouvelles expériences d'immunoprécipitation à grande échelle ont donc été réalisées sur des cellules NIH/3T3, sur différentes CPAA ($CPAA^{A2.1}$, $CPAA^{A2.1/M1m}$ $CPAA^{A2.1/M1}$, $CPAA^{A2.1/MART-1}$, $CPAA^{A2.1/FSP02}$, $CPAA^{A2.1/TGF\beta R2(-1)V1}$ et $CPAA^{A2.1/TGF\beta R2(-1)V2}$) et sur des lignées tumorales HLA $A2.1^{+}$ de cancer colorectal (Colo205 et HCT116). Les résultats de ces diverses expériences ont fait l'objet de l'article I présenté ci-après.

Le tableau ci-dessous résume les différentes étapes d'évolution du protocole d'élution de peptides HLA-A2.1 restreints mis au point à partir des CPAA.

<table>
<tr><th colspan="2">Solubilisation des complexes HLA-A2.1</th><th colspan="3">Immunoprécipitation</th><th colspan="2">Elution</th><th>Spectrométrie de masse</th></tr>
<tr><th>Nombre de cellules</th><th>Tampon</th><th>Quantité de protéine</th><th>Anticorps Anti-HLA-A2</th><th>Billes de sépharose</th><th>Méthode</th><th>Nombre</th><th>Nombre d'éluats analysée</th></tr>
<tr><td rowspan="2">10^6</td><td>Abcam/RIPA</td><td>750 µg</td><td>Commercial/ couplage non covalent</td><td rowspan="2">Protéine A</td><td>Elution après ajout de TFA</td><td>3</td><td rowspan="2">1</td></tr>
<tr><td>Abcam</td><td>1 mg</td><td>Commercial, purifié/ couplage non covalent</td><td>Incubation (0 – 1h) avec TFA ou chauffage 95°C pendant 5 min</td><td>5</td></tr>
<tr><td rowspan="2">10^8</td><td>Abcam</td><td>20 mg</td><td>purifié/ couplage non covalent</td><td>Protéine A</td><td>Incubation 15 min avec TFA</td><td>6</td><td>3</td></tr>
<tr><td>Abcam/CHAPS</td><td>200 mg</td><td>Purifié/ couplage covalent</td><td>Protéine A/ CNBr</td><td>Incubation 15 min avec TFA</td><td rowspan="2">8</td><td rowspan="2">8</td></tr>
<tr><td rowspan="2">10^9</td><td rowspan="2">CHAPS</td><td>400 mg</td><td rowspan="2">Purifié/ couplage covalent</td><td rowspan="2">CNBr</td><td rowspan="2">Incubation 15 min avec TFA</td></tr>
<tr><td>800 mg</td></tr>
</table>

Tableau 5 : Résumé des grandes étapes de mise au point du protocole d'élution de peptides HLA-A2.1-restreints à partir des cellules présentatrices d'antigène artificielles

II. Article I : Highly immunogenic peptides of clinical interest can escape mass spectrometry detection

Original article (manuscript in preparation)

Highly immunogenic peptides of clinical interest can escape mass spectrometry detection

Hafid Kora[1], Philippe Chan[2], Ophélie Robine[1], Sami Gouas[1], Estelle Dupel[1], Alexandre Couture[1], Pauline Maby[1], Laurent Drouot[3], Sébastien Feuillette[1], Abdelilah Bouzelfen[5], Marie-Laure Wallet-Balieu[2], Jérôme Leprince[4], David Vaudry[2, 4], Thierry Frébourg[1, 6], Jean-Baptiste Latouche[1, 6]

[1]Inserm U1079, Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), Rouen University, Normandy University and Department of Genetics, Rouen University Hospital, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France;

[2]Proteomic Facility PISSARO, IRIB, Rouen University, Mont-Saint-Aignan, France;

[3]Inserm U905, IRIB, Rouen University, Rouen, France;

[4]Inserm U982, IRIB, Rouen University, Mont-Saint-Aignan, France;

[5]Inserm U918, IRIB, Rouen University, Henri Becquerel Center;

[6]Department of Genetics, Rouen University Hospital, Rouen, France

Corresponding Author: *Jean-Baptiste Latouche, Inserm U1079, 22 boulevard Gambetta, 76083 Rouen Cedex, Rouen, France. Phone: 33(0)232880397; Fax: 33(0)235148237; Mail: jean-baptiste.latouche@chu-rouen.fr*

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.

The authors disclose no potential conflict of interest.

Abstract

Recent immunotherapy clinical trials based on the use of checkpoint inhibitors have proven notable clinical benefits in different cancers. Identification of highly immunogenic tumor antigens is now required for the development of personalized immunotherapy approaches based on specific anti-tumor T lymphocyte (TL) stimulation. Mass spectrometry characterization of tumor antigen-derived peptides eluted after HLA-peptide immunoprecipitation is often used for this purpose.

Artificial Antigen Presenting Cells (AAPCs) developed in the laboratory are capable of expressing tumor antigens as transgene-encoded immunogenic peptides or transgene-encoded full length proteins degraded into these immunogenic peptides, presented within the most frequent HLA class I molecule, A2.1. With the goal of identifying such peptides, immunoprecipitation of HLA-A2.1-peptide complexes and mass spectrometry characterization of the eluted peptides was performed.

Starting from AAPCs encoding known immunogenic epitopes derived from MART-1, an autoantigen overexpressed in melanoma, or from TFGβR2 mutated proteins, neoantigens expressed in microsatellite unstable colorectal cancers, peptide mass spectrometry characterization was possible. On the contrary, starting from AAPCs encoding full length MART-1 autoantigen or TFGβR2 neoantigens, peptide mass spectrometry characterization was not possible. However, all AAPCs efficiently presented the relevant epitopes on their HLA-A2.1 molecules, as they all were able to stimulate robust specific CTL responses against them. Moreover, starting from HLA-A2.1^{+} microsatellite unstable colorectal cancer cell line which was specifically lysed by these CTLs, peptide mass spectrometry characterization was not possible either.

Highly immunogenic epitopes can therefore escape mass spectrometry detection and should render cautious when characterizing peptides of clinical interest with this technique.

Keywords: tumor antigen; tumor peptide; cytotoxic T lymphocyte; artificial antigen presenting cell; MHC class I molecule; HLA-A2.1; mass spectrometry

Introduction

These last three decades, immunotherapy has become a promising cancer treatment in addition to traditional approaches such as surgery, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapy[1–3]. Recent implementation of "anti-checkpoint" antibodies, particularly anti-PD-1, anti-PD-L1 and anti-CTLA-4, that reinforce the natural cellular anti-tumor immune response[4–7], and the success of adoptive cellular immunotherapy approaches by transferring tumor antigen-specific T lymphocytes (TLs) in melanoma[8], have revived interest for cellular immunotherapy approaches in cancer. In this context, characterization of immunogenic peptides of clinical interest, able to specifically stimulate efficient anti-tumor cytotoxic T lymphocytes (CTLs), for the development of effective adoptive cellular immunotherapy or dendritic cell- or tumor antigen-based vaccine approaches presents a real clinical potential. Indeed, tumor cells differ from normal cells by the differential expression of tumor-associated antigens or tumor-specific antigens. Tumor antigens present in the tumor microenvironment or contained in tumor cells undergoing cell death, can be captured by antigen-presenting cells (APCs), and presented at their surface as antigenic peptides on human leukocyte antigen (HLA) molecules. When these antigenic peptides are presented at the APC surface by HLA class I (HLA-I) molecules, they can specifically activate CTLs. Peptides that typically bind HLA class I molecules are between 8 to 12 amino acid-long, and bind the HLA groove by both their N-terminal and C-terminal extremities. In most cases, these peptides have a length determined by the HLA allele, such as nonamers or decamers for HLA-A2[9]. If the same peptides bound to HLA-I molecules at are the surface of tumor cells specifically recognized by T cell receptors (TCRs) of activated CTLs, a cascade of apoptotic signals, and the secretion of various cytokines will be initiated, leading to the death of these tumor cells. Identification of immunogenic tumor-specific HLA-restricted peptides remains a critical issue for the development of efficacious adoptive cellular immunotherapy or vaccine therapy strategies.

In order to stimulate specific CTLs against tumor antigens in a simple and reproducible manner for the development of specific immunotherapy (adoptive cellular immunotherapy or vaccine therapy) strategies, artificial antigen presenting cells (AAPCs) have been generated from murine fibroblast cell line NIH/3T3 in our laboratory[10]. After gamma-retroviral transduction, AAPCs encode the following molecules: the accessory molecules CD54, CD58 and CD80, the human β2-microglobulin and an HLA class I heavy chain, recreating an immunological synapse. In this study, AAPCs expressing HLA-A2.1, the

most common HLA class I molecule, expressed by 40% of caucasian individuals, were used. It is important to note that these AAPCs are able to present a directly encoded immunogenic peptide of interest, but also to degrade transduced full-length antigens and present them in the form of immunogenic peptides on HLA molecules to TLs, like autologous cells[10–14]. Based on this potential to degrade expressed antigens, our AAPCs can be used to characterize peptides and proteins immunogenic. These AAPCs were used in this study to try to directly identify tumor epitopes based on affinity chromatography purification of the HLA-A2.1/peptide complexes expressed by these cells and mass spectrometry analysis of eluted peptides. The direct approach of identifying HLA-restricted epitopes has already been used for identifying HLA-restricted epitopes from tumor cell lines[15–19], and from several malignant tumors such as renal cell carcinoma[20] or cholangiocarcinoma[21]. The aim of this work was to characterize by mass spectrometry peptides of potential therapeutic interest that derive from tumor antigens after immunoprecipitation of HLA-A2.1 complexes expressed by our AAPCs. Here, we used tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography, which has been until today the technology allowing the rapid identification of hundreds of MHC ligands in different experimental approaches. In this study, we focused on known immunogenic model peptides restricted to the HLA-A2.1 molecule. The M1 peptide and the modified M1 peptide (M1m) are used in different preclinical and clinical studies[24–27] derived from the Melan-A/ MART-1, autoantigen overexpressed in 80% of melanoma, and known to elicit a spontaneous cellular HLA-A2.1-restricted response[22,23]. The first neopeptide described as immunogenic in microsatellite instability colorectal cancers (MSI CRCs), FSP02, derived from a mutated TGFβR2 protein[28] is also known to elicit a spontaneous cellular HLA-A2.1-restricted response. In MSI CRCs, there is a particular interest in identifying such neopeptides since in these tumors, a loss of function of the DNA mismatch repair system (MMR) is responsible for insertions or deletions in coding repeated regions, leading to the generation of many neoantigens, which can be fragmented into neopeptides called "frameshift peptides" or FSPs[29] which could be highly immunogenic. Indeed, MSI CRC patients are characterized by a high density of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) associated with a better prognosis[30] and these TILs could be specific of neoantigens expressed by the cancer cells. Starting from AAPCs encoding the known immunogenic M1m, M1 or FSP02 peptide we could mount robust CTL responses against them and succeeded in characterizing them by mass spectrometry. Starting from AAPCs encoding the full-length proteins, from which these peptides are derived, we could mount equivalently robust CTL responses against them but did not succeeded

characterizing them by mass spectrometry. Therefore, highly immunogenic peptides, capable of stimulating strong anti-tumor cellular immune responses, may not be detected by mass spectrometry, rendering questionable the use of this technique for selecting clinically relevant peptides.

Material and methods

Cell lines

NIH/3T3 murine fibroblasts (ATCC, Manassas, VA) and artificial antigen presenting cells encoding the HLA-A2.1 molecule and the following antigens: MART-1 derived peptide (M1, $AAPC^{A2.1/M1}$), MART-1 derived modified peptide (M1m, $AAPC^{A2.1/M1m}$), MART-1 full-length antigen (MART-1, $AAPC^{A2.1/MART-1}$), *TGFβR2*(-1)-derived neopeptide (FSP02, $AAPC^{A2.1/FSP02}$), isoforms 1 and 2 of *TGFβR2*(-1)-derived full-length neoantigen (V1, $AAPC^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$) and (V2, $AAPC^{A2.1/TGFβR2(-1)v2}$), *CASP5*(-1)-derived full-length neoantigen (CASP5(-1), $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) containing 10% Donor Calf Serum (DCS, Hyclone ThermoFisher Scientific). HLA-$A2.1^+$ colorectal cancer cell lines Colo205 and HCT116 (ATCC) were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, ThermoFisher Scientific) containing 10% Fetal Calf Serum (FCS, ThermoFisher Scientific). The hybridoma cell line HB82 (ATCC) was cultured in DMEM containing 10% FCS and supplemented with 1.5 g/L sodium bicarbonate and 1 mM sodium pyruvate. Two mM L-glutamine (ThermoFisher Scientific) and a mix of antibiotics (penicillin, 100 UI/mL, and streptomycin, 10 µg/ml, ThermoFisher Scientific) were added in all culture media. Cells were incubated at 37 °C in the presence of 5% CO_2. PCR-based "mycoplasma tests" were performed on each cell lines and no contamination was detected.

Purification of T lymphocytes

TLs were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HLA-$A2^+$ MSI CRC patients and healthy donors, after having obtained their informed consent. PBMCs were isolated by centrifugation on Ficoll (Eurobio, Courtaboeuf, France) during 20 minutes at 2000 rpm. PBMCs were washed 3 times with 1x PBS (Phosphate Buffered Saline, ThermoFisher Scientific) and centrifuged for 10 minutes at 1200 rpm at 4 °C. The cells were then resuspended in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific) containing 10% FCS (Thermo Fisher Scientific). Two mM L-glutamine (ThermoFisher Scientific) and a mix of antibiotics (penicillin, 100 UI/mL, and streptomycin, 10 µg/ml, ThermoFisher Scientific) were added in culture medium. The number of cells was determined using the automatic cell counter ADAM (NanoEnTek, Pleasanton, CA). The next day, in order to separate TLs from other cells (monocytes, B lymphocytes, natural killers), the Dynabeads® Untouched Human T cells kit (Thermo Fisher Scientific) was used according to the manufacturer's instructions.

Coculture of TLs and AAPCs

In order to stop their division, the HLA-A2.1^{+} AAPCs were irradiated at 25 Gy (IRIB, Rouen, France). After irradiation, the cells were washed with 1x PBS and resuspended in AIM-V (Thermo Fisher Scientific) medium with 5% DCS, and 75,000 cells were deposited in each well of a 24-well plate. The next day, 750,000 purified TLs resuspended in serum-free AIM-V medium were added to the AAPCs. After 7 days of coculture, IL-2 (R & D Systems, Lille, France) was added every 2nd day at a concentration of 20 IU/ml during 21 days. Coculture experiments were also carried out with 5,000 non-irradiated AAPCs per well.

Flow cytometry

To determine their phenotype, 100,000 cells were washed and resuspended in PBS with 0.1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 2mM EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

Anti-β2m-PE (Phyco-Erythrin), anti-HLA-A2-FITC (Fluorescein Iso-Thyo-Cyanate), anti-CD54-PE, anti-CD58-FITC and anti-CD80-FITC antibodies from ThermoFisher Scientific were used to verify AAPC phenotype before each coculture. After coculture, to evaluate their specificity, TLs were incubated with M1 (AAGIGILTV)-dextramer or control-dextramer (Immudex, Copenhagen, Denmark) for 15 minutes in the dark at room temperature. Phenotypic studies were carried out using the FACS Canto cytometer (Beckton Dickinson, Inserm U905, Rouen, France) and the FlowJo software (Tree star, Ashland, OR).

Cytotoxicity assays

The cytotoxic activity of stimulated TLs was assessed by performing standard ^{51}Cr release assays as previously described[412]. Briefly, target HLA-A2.1^{+} T2 cells (ATCC), were loaded with different peptides (either irrelevant, M1 or FSP02) at 10 µM for 1 h at room temperature. These cells were then labeled with ^{51}Cr (for 1 h at 37°C) and distributed into 96-well U-bottomed plates (5,000 cells per well). Target cells and TLs were co-incubated at different effector to target ratios as specified at 37°C, for 4 hours. The level of cell lysis was calculated by using the following equation: [(mean experimental counts per minute (cpm) - mean spontaneous cpm)/(mean maximum cpm - mean spontaneous cpm)].

Total protein extraction of NIH/3T3 and AAPC cell lines

After removing the culture medium and washing the cells with PBS, the culture dishes were placed on ice and cells were harvested by mechanical separation using a scraper. All following steps were performed at 4°C. Cells were centrifuged at 660 g for 5 minutes, and then resuspended in 1% of 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS, Sigma-Aldrich). A complete protease inhibitor tablet (Sigma-Aldrich) was added in CHAPS according to manufacturer's instructions. Cells were placed under agitation for 1 h and then sedimented at 2000 g for 20 minutes. A final step of ultracentrifugation was performed at 150 000 g during 1h to remove cellular debris. The protein supernatant was quantified by the method of Lowry and stored at - 80°C before the HLA-A2.1 protein immunoprecipitation experiments.

Anti-HLA-A2 antibody purification

The BB7.2 monoclonal antibody (anti-HLA-A2) was purified from hybridoma cell line HB82 culture supernatants with protein G-Sepharose beads (ThermoFisher Scientific) according to the supplier's instructions.

Coupling of anti HLA-A2 antibody to cyanogen bromide (CNBr)

Before the step of immunoprecipitation, the anti-HLA-A2 antibody was covalently coupled to CNBr activated Sepharose 4B (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Each step of antibody immobilization was performed at room temperature. First, CNBr-activated sepharose 4B was slowly stirred in 1 mM HCL for 15 minutes. After a centrifugation step at 1000 g for 5 minutes without brake, sepharose was resuspended in antibody-coupling buffer (0.5M NaCL, 0.1M $NaHCO_3$ pH 8.3) and anti-HLA A2 antibody was added. The mix of sepharose and antibody was stirred for 2 to 3 hours. Coupling efficiency was determined by measuring the absorbance at 280 nm. Once the desired coupling efficiency (≥ 90% immobilized antibody) was obtained, a solution of 0.2 M glycine was added and the mix was agitated for 1h. At the end of this step the anti-HLA-A2 antibody covalently coupled to CNBr was resuspended in a solution of 0.02% sodium azide and stored at 4°C.

Immunoprecipitation of HLA-A2.1 bound peptides

HLA-A2.1/peptide complexes were isolated from AAPCs by immunoprecipitation (IP) using the anti-HLA-A2 antibody covalently coupled to CNBr sepharose. First, 800mg of

total protein extract was added to the sepharose beads covalently coupled with 4 mg of anti-HLA-A2 antibody. The mixture was stirred overnight at 4 °C. The next day, CNBr beads were sedimented at 1000 g for 5 minutes. The beads were washed six times with 20 mL of PBS at 1000 g for 5 min at 4°C without brake. Finally, the elution steps to separate HLA-A2.1 molecules and peptides of interest were performed with 0.2% trifluoroacetic acid (TFA, Sigma-Aldrich). The beads were incubated for 15 minutes with TFA, and eight elutions with 1mL of TFA were carried out. Western blot experiments were performed to verify the efficiency of HLA-A2.1 IP.

Western blotting

Fifty µg of total proteins extracted from NIH/3T3 or AAPC cell lines and 20 µL of each IP elution fraction were analyzed by SDS-PAGE. Protein separation was performed under reducing conditions (in the presence of DTT: Dithiothreitol). Separated proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond C-extra, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) prior to blotting and immunodetection by chemiluminescence (Amersham Biosciences). The membrane was saturated with a blocking solution (5% skimmed milk and 0.05% Tween 20 in 1x PBS) for 1 h and incubated overnight with the anti-HLA-ABC primary antibody (clone EMR8-5, Abcam, Cambridge, UK) at a 1:1000 dilution. The membrane was then incubated with peroxidase-labeled anti-mouse IgG secondary antibody from Jackson Immunoresearch Laboratories (WestGrove, PA, USA). Proteins obtained on the membrane were finally revealed with ECL (Enhanced Chemiluminescence, Life Technologies, Courtaboeuf, France), and the signals were detected with a GBOX (Syngene, Cambridge, UK) controlled by the Snap Gene software (Syngene).

Synthetic peptides

M1m (ELAGIGILTV), M1 (AAGIGILTV) and FSP02 (RLSSCVPVA) peptides were synthesized by Rouen University Proteomic Facility PISSARO (IRIB, Inserm U982, France). Peptides were stored at -20°C. All peptides were analyzed for purity by high performance liquid chromatography (HPLC). Only peptides with purity superior to 90% were used.

Peptide identification and sequencing by mass spectrometry

After desalting on Ziptip (Sigma-Aldrich), synthetic peptides were resuspended in 10 µL of 3% (v/v) acetonitrile (ACN) and 0.1% (v/v) formic acid, and then analyzed with a

nano-LC1200 system coupled to a Q-TOF 6550 mass spectrometer equipped with a nanospray source and an HPLC-chip cube interface (Agilent Technologies). A 20 min linear gradient (3–75% acetonitrile in 0.1% formic acid), at a flow rate of 350 nL/min, was used to separate peptides on the Agilent polaris-HR-Chip C18 column (150 mm long x 75 µm inner diameter). Full auto-MS1 scans from 290 to 1700 mass-to-charge (*m/z*) and auto-MS2 scans from 59 to 1700 *m/z* were recorded. For each cycle, a maximum of 5 precursors were isolated and fragmented in the collision cell. Absolute threshold for precursor selection was set to 1000 counts (relative threshold 0.001%). For protein identification, peak lists were extracted, *de novo* sequenced and compared with specific databases using the PEAKS studio 7.5 proteomics workbench software (Bioinformatics Solutions Inc., build 20150615). The searches were performed with the following specific parameters: (1) enzyme specificity, (2) variable modifications (oxidation (M), pyro-glu from E and Q), (3) monoisotopic, (4) mass tolerance for precursor ions (20 ppm), (5) mass tolerance for fragment ions (50 ppm), (6) MS scan mode (quadrupole), (7) MS/MS scan mode (time of flight), (8) databases (specific target gene coding sequences). Only significant hits with false discovery rate (FDR) lower than 1% for peptide and protein cut-off ($-\log P \geq 20$) were considered.

Results

AAPCs stably express an immunogenic peptide or the full-length protein this peptide is derived from.

AAPCs, expressing HLA heavy chain A2.1, β2-microglobulin, CD54, CD58 and CD80 transmembrane molecules, are derived from NIH/3T3 mouse fibroblast cell line and have proven very efficacious for activating specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), as already reported[11,31]. The γ-retroviral vector "SFG" (derived from Moloney Murine Leukemia Virus), deleted of all sequences encoding viral proteins, was used for our peptide and full-length protein constructions as previously described[11,31]. Dicistronic vectors containing an internal ribosome entry site (IRES) sequence which initiates the co-translation of a transgene encoding an immunogenic peptide or a full-length protein and of a transgene encoding a puromycin resistance element, allowed to select the cells with this antibiotic, at a high level, as verified by RT-qPCR (data not shown). For the peptide constructs, sequence encoding a signal peptide derived from the human CD8 α chain leader (hCD8αL, MALPVTALLLPLALLLHASQA) is placed upstream of peptide-encoding sequence which allows addressing of the peptide of interest in the endoplasmic reticulum (Figure 1A), for optimal loading on HLA-A2.1 molecule after cleavage (PSORT and SignalP websites were used for correct cleavage site prediction). For the protein constructs, the full-length protein of interest is expressed in the cytoplasm so that it is processed by our AAPCs like an endogenous protein using MHC-I classical antigen presentation machinery. After transduction of our AAPCs with theses constructs, a high level and stable expression heavy chain HLA-A2.1, β2-microglobulin, CD54, CD58 and CD80 transmembrane molecules was always observed by flow cytometry, even after several weeks in culture (Figure 1B).

AAPCs irradiated or non-irradiated before coculture, are equivalently able to efficiently activate M1 peptide-specific TLs.

In our experiments, in a preclinical setting, AAPCs are usually irradiated to stop their division for avoiding their overgrowth and for safety reasons. As in the immunoprecipitation experiments large amounts of non-irradiated cells were used, the ability of non-irradiated cells to present an antigen of interest had to be evaluated. TLs from healthy donors were cultured respectively with AAPCs encoding M1m peptide, M1 peptide or MART-1 protein (Figure 2). After one stimulation, similar percentages of M1-dextramer positive TLs (4 to 8 %) were obtained with irradiated and non-irradiated $AAPC^{A2.1/M1m}$, $AAPC^{A2.1/M1}$ and $AAPC^{A2.1/MART-1}$.

Interestingly, these specifically TLs lysed T2 cells pulsed with M1 peptide in a similar way in standard ^{51}Cr release assays (data not shown). We could therefore use non-irradiated AAPCs for HLA-A2.1 restricted peptide characterization.

MART-1 derived peptides were characterized by mass spectrometry, starting from AAPCs encoding M1m or M1 peptide (AAPC$^{A2.1/M1m}$ and AAPC$^{A2.1/M1}$) but not starting from AAPCs encoding full-length MART-1 protein (AAPC$^{A2.1/MART-1}$).

Healthy donor TLs were cultured respectively with AAPCs encoding M1m peptide, M1 peptide or full-length antigen MART-1 (Figure 3A). After one stimulation, TLs stimulated with AAPC$^{A2.1/M1m}$, AAPC$^{A2.1/M1}$ or AAPC$^{A2.1/MART-1}$ specifically lysed in a similar manner T2 cells pulsed with M1 peptide (Figure 3A) as assessed in standard ^{51}Cr release assays. These AAPCs effectively present the relevant peptide on HLA-A2.1 molecules. We could therefore carry out the immunoprecipitation (IP) experiments of the HLA-A2.1 molecules.

Protein extracts from NIH/3T3, AAPC$^{A2.1}$, AAPC$^{A2.1/M1m}$, AAPC$^{A2.1/M1}$ and AAPC$^{A2.1/MART-1}$ were immunoprecipitated. NIH/3T3 cells and AAPC$^{A2.1}$ were used as negative controls. HLA-A2.1 protein was detected in the protein extracts and IP products of each AAPC by western blot (Figure 3B). On the spectra of AAPC$^{A2.1/M1m}$, AAPC$^{A2.1/M1}$ and AAPC$^{A2.1/MART-1}$ IPs, taking into account the different monoisotopic masses we obtained, a general profile corresponding to different peptides was observed. Ion 985.61 (1+) corresponding to ELAGIGILTV (M1m) decamer was detected at a retention time of 13.071 min and sequenced by peaks software in the various eluates from AAPC$^{A2.1/M1m}$. In AAPC$^{A2.1/M1}$ IP, ion 443.27 (2+) corresponding to AAAGIGILTV decamer (1A from the signal sequence + M1 peptide sequence) was detected at a retention time of 11.700 min and sequenced by peaks software (Figure 3B). However, in AAPC$^{A2.1/MART-1}$ IP, M1 (AAGIGILTV) peptide known to be efficiently presented on HLA-A2.1 molecules by these AAPCs, as they stimulate robust M1-specific CTL response wasn't identified (Figure 3B). Furthermore, no peptide derived from the full length MART-1 protein sequence transduced in our AAPCs was detected.

FSP02 neopeptide was characterized by mass spectrometry, starting from AAPCs encoding it (AAPC$^{A2.1/FSP02}$) but not starting from AAPCs encoding full-length TGFβR2 mutated protein (AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ and AAPC$^{A2.1/\ TGFβR2(-1)v2}$).

MSI CRC patients TLs were cultured respectively with AAPCs encoding FSP02 neopeptide (Figure 4A) or full length mutated antigen TGFβR2 (a frequently mutated protein in MSI CRCs, AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ and AAPC$^{A2.1/\ TGFβR2(-1)v2}$). V1 and V2 are two isoforms of mutated antigen TGFβR2 that were cloned after RT-PCR of a MSI CRC patient tumor harboring the mutation. After one stimulation, TLs stimulated with AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ or AAPC$^{A2.1/\ TGFβR2(-1)v2}$ specifically lysed in a similar manner T2 cells pulsed with FSP02 neopeptide as assessed in a standard ^{51}Cr release assays. These AAPCs effectively present the immunogenic FSP02 neoepitope on HLA A2.1 molecules (Figure 4A). We could therefore carry out the immunoprecipitation (IP) experiments of the HLA-A2.1 molecules.

Protein extracts from NIH/3T3, AAPC$^{A2.1}$, AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ and AAPC$^{A2.1/\ TGFβR2(-1)v2}$ were immunoprecipitated. NIH/3T3 cells and AAPC$^{A2.1}$ were used as negative controls. HLA-A2.1 protein was detected in the protein extracts and IP products of each AAPC by western blot (Figure 4B). On the spectra of AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ and AAPC$^{A2.1/\ TGFβR2(-1)v2}$ IP, taking into account the different monoisotopic masses we obtained, a general profile corresponding to different peptides was observed. Ion 466.25 (2+) corresponding to RLSSCVPVA (FSP02) nonamer was detected at a retention time of 7.967 min and manually sequenced in the various eluates from AAPC$^{A2.1/FSP02}$, but not in the various eluates from AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ and AAPC$^{A2.1/\ TGFβR2(-1)v2}$ (Figure 4B). Nevertheless, in AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v2}$ IP, the decamer GLLRGLWPLH (m/z ratio = 387.90 (+3), retention time = 15.02), found in the wild-type part of the full-length protein could be detected and sequenced (Supplementary Data, Figure 1).

Analysis of HLA-A2.1 binding peptides derived from the immunoprecipitation of HLA-A2.1$^+$ MSI CRC cell line HCT116 does not allow the identification of peptides that are the targets of well documented specific cytotoxic T cell responses.

MSI CRC patient TLs stimulated with AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/FSP25}$, AAPC$^{A2.1/FSP26}$ or AAPC$^{A2.1/FSP30}$ specifically lysed HLA-A2.1$^+$ MSI CRC cell line HCT116 as assessed in standard ^{51}Cr release assays (Figure 5A). The target cells effectively present the FSP02[31],

FSP25, FSP26 and FSP30[31] neopeptides on HLA-A2.1 molecules to specific CTLs. We could therefore carry out the IP experiments of the HLA-A2.1 molecules.

Protein extracts from HCT116 microsatellite unstable CRC cell line and Colo205 microsatellite stable CRC cell line were then immunoprecipitated. HLA-A2.1 protein was detected in the protein extracts and IP products of both two tumor cell lines by western blot (Figure 5B). On the spectra of Colo205 and HCT116 IPs, taking into account the different monoisotopic masses we obtained, a general profile corresponding to different peptides was observed. Nevertheless, FSP02, FSP25, FSP26 and FSP30 neopeptides were not detected by mass spectrometry in HLA-A2.1^{+} MSI CRC cell line HCT116 IP products.

Discussion

In order for tumor peptides to be eligible for adoptive cellular immunotherapy or vaccine therapy, it is necessary to identify them before validating their immunogenicity by functional cellular tests. In this study, we used a direct identification approach of HLA-restricted peptides, based on immunoprecipitation of HLA-peptide complexes expressed by AAPCs and a determination of peptide sequences by mass spectrometry. Our AAPCs are able of expressing and degrading full length antigens, and of presenting peptides of interest derived from the degradation of these antigens within the HLA-A2.1 molecule like human A2.1$^+$ cells[10–14]. Tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography, a standard technology for rapid identification of MHC ligands was used for this study. Three known immunogenic model peptides, expressed by our AAPCs, were studied. The M1 peptide and the modified M1 peptide (M1m) are derived from the protein MART-1, autoantigen overexpressed in melanoma[22,23]. The first neopeptide described as immunogenic in MSI CRCs, FSP02 is derived from a mutated TGFβR2 protein [28]. In MSI CRCs, there is a particular interest in identifying immunogenic neopeptides, since in these tumors we have previously shown with on large cohort of MSI CRC patients with that the number and spectrum of frameshift mutations were correlated with the density of not only total CD3$^+$ but also CD8$^+$ cytotoxic tumor infiltrating lymphocytes in the tumor[31,32]. We also demonstrated in HLA-A2.1$^+$ patients that anti-tumor CD8$^+$ CTL specific responses could be obtained *in vitro* against frameshift mutations present in their tumor, thus paving the way for the development of new immunotherapy strategies.

AAPCs used for this work stably expressed the β2m, HLA-A2.1, CD54, CD58 and CD80 molecules and were resistant to puromycin used to selected the cells expressing the antigen against which a specific cytotoxic T cell response is mounted. All transduced AAPCs expressed the antigen of interest at a high level as confirmed by RT-qPCR. Until now, the cocultures of our AAPCs with TLs have always been carried out using irradiated AAPCs, in order to stop their division for avoiding AAPCs overgrowth and for safety reasons, as we developed our approach in a preclinical setting. For mass spectrometry experiments, considering the large quantities of cells we had to use, it appeared impossible to irradiate all cells in the same conditions as for our cocultures before HLA-A2.1 solubilization. Interestingly non-irradiated as well as irradiated AAPCs (expressing a peptide or protein of interest) were able of expressing transgene-encoded but of degrading transgene-encoded full-length antigens into tumor peptides efficiently presented within the HLA-A2.1 molecules they

expressed to specific CTLs. Based on these results, experiments of immunoprecipitation of the HLA-A2.1 molecules expressed by our AAPCs were then carried out. With negative control NIH/3T3 cells, not transduced with HLA-A2.1 molecule, no HLA-A2.restricted -peptides were detected. From each AAPC, the peptide amino acid length was between 8 and 13 (Supplementary Data, Figure 2A). The majority of these peptides were 9 or 10 amino acid long as most often described HLA-A2.1-restricted peptides. Indeed, the HLA-A2.1 groove is known to particularly bind nonamers and decamers. In addition, the nonamers were observed predominantly presented amino acids leucine (L), valine (V) and alanine (A) at the P2 and C-terminal position (Supplementary data, Figure 2B). The same kind of results were obtained with decamers. We therefore confirmed here, as already shown by previous studies, that amino acids L, V, and A are strong HLA-A2.1 groove[9,33] anchor motifs. In addition, starting from $AAPC^{A2.1/M1m}$ and $AAPC^{A2.1/FSP02}$, M1m and FSP02 peptides were respectively detected and sequenced. These results allowed us to establish the proof of concept of feasibility of our direct approach of HLA-A2.1-restricted peptide characterization from AAPCs. Surprisingly, the AAAGIGILTV peptide was identified starting from the $AAPC^{A2.1/M1}$ in place of the expected AAGIGILTV (M1) peptide. Indeed, in our peptide constructs, a sequence derived from the human CD8 alpha leader (hCD8αL, MALPVTALLLPLALLLHASQA) is added upstream of the peptide of interest sequence in order to allow its addressing to the endoplasmic reticulum and it optimal presentation on HLA-A2.1 molecule after cleavage. Despite a high confidence level of cleavage prediction between hCD8αL and M1 peptide, the AAAGIGILTV peptide identified by mass spectrometry shows that the cleavage did not occur as expected in the $AAPC^{A2.1/M1}$. Our approach can therefore also be used to provide biochemical data to refine the accuracy of peptide cleavage prediction softwares. However, we were able with $AAPC^{A2.1/M1}$ to activate specific TLs against the M1 peptide. A work of Derré *et al*, already showed that PBMCs, clones or TILs derived from HLA-$A2.1^{+}$ healthy donors and melanoma patients activated against the AAGIGILTV peptide were also able to specifically recognize the AAAGIGILTV peptide[34]. AAAGIGILTV-specific CTLs might then be stimulated by our AAPCs, capable of also recognized the AAGIGILTV peptide. However, we can't exclude that, in the $AAPC^{A2.1/M1}$, there is indeed a well-cleaved AAGIGILTV peptide presentation but in a much lower amount, therefore below mass spectrometry minimum detection threshold level. Starting from AAPCs expressing MART-1 and TGFβR2(-1) full-length proteins, M1 and FSP02 peptides could be not detected. Nevertheless, starting from $AAPC^{A2.1/TGF\beta R2(-1)v2}$, the decamer GLLRGLWPLH found in wild-

type part of V2 TGFβR2(-1) full length protein could be identified. This peptide could therefore be more expressed or more stably presented by the HLA-A2.1 molecule than the immunogenic FSP02 peptide. To determine the putative immunogenicity of this decameric peptide, cocultures of TLs with AAPCs encoding this peptides could be performed. However, this peptide being in the wild-type part of the protein, phenomena of central and/or peripheral tolerance have probably been developed against it i*n vivo*. The amount of M1 or FSP02 peptide presented by full-length protein expressing AAPCs was not sufficient for mass spectrometry detection but nevertheless sufficient to efficiently activate TLs. This could confirm the emblematic work of Lanzavecchia's team 20 years ago on the amount of MHC-peptide complexes required to activate specific TLs[35]. APCs pulsed with low concentrations of peptides (50nM) were shown by this team to display about 100 MHC-peptide complexes. These 100 MHC-peptide complexes could interact with about 18,000 TCRs, suggesting that a single MHC-peptide complex could be sufficient to activate 180 TCRs[35]. In their experiments, the lowest tested concentration of peptides was 50 nM, and we can not exclude that less than 100 MHC-peptide complexes could be sufficient to activate TLs. We calculated that, starting from AAPCs encoding immunogenic peptides, 150 MHC-peptide complexes per cell were detected. According to our calculations, below this threshold of 150 MHC-peptide complexes per cell, it would therefore be impossible to detect immunogenic peptides by conventional technologies mass spectrometry. As shown here, HLA-A2.1^{+} MSI CRC cell line HCT116 specifically lysed by CTLs stimulated with AAPCs encoding FSP02, FSP25, FSP26 or FSP30 neopeptide, or CASP5 mutated neoantigen from which FSP25 and FSP26 are derived (Kora *et al* manuscript in preparation). Importantly, these immunogenic FSPs could not be detected by mass spectrometry despite a presentation on HLA-A2.1 molecules sufficient for being the target specific CTLs. In addition, in different studies, starting from HLA-A2.1^{+} human tumor cell lines such as HCT116[36], SW1116[37], FM-82, FM-93/2, Mel-624, MeWo and SK-Mel-5[38], known immunogenic peptides could not be detected either by mass spectrometry. Surprisingly, among the peptides we could detect in our immunoprecipitation products, 90% were "*de novo"* sequences as they were not present in existing peptide databases. Some of these "*de novo"* peptides could be derived from peptide splicing phenomenon that occurs in the proteasome. Peptide splicing is a newly described mechanism of production of peptides by the proteasome, involving binding of fragments originally distant in the parental protein (s)[39–42]. This phenomenon might limit the

presentation of peptides of interest even through their expression might be suffient to elicit efficient CTL responses.

We have demonstrated in this study that highly immunogenic peptides can be presented in such a low amount that they escape classical mass spectrometry detection and characterization. The use of this technique for identifying the most clinically relevant peptides is therefore questionable. But, the development of fairly more sensitive mass spectrometry technologies to identify peptides presented below the threshold of 100/150 MHC-peptides complexes per cell could in the near future, and of biosoftwares taking into account peptide splicing phenomena revolutionize the field of HLA-restricted peptide characterization for the development of immunotherapy strategies.

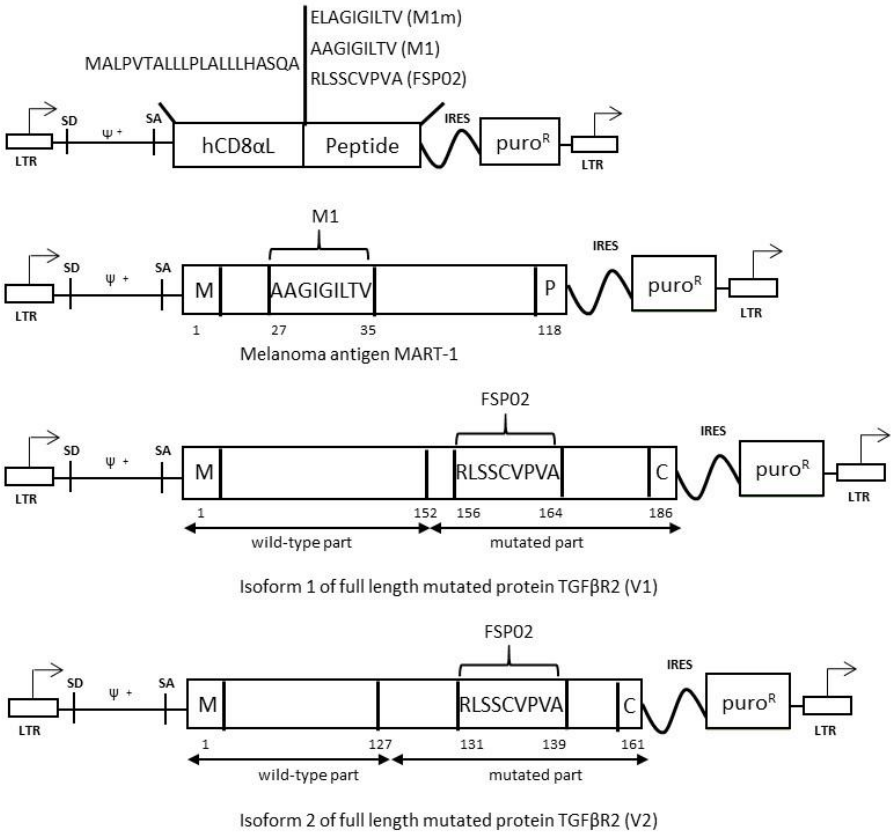
References

1. Characiejus, D. Cancer immunotherapy: Benefit and harm? *Oncoimmunology* **1,** 232–233 (2012).
2. Lesterhuis, W. J., Haanen, J. B. A. G. & Punt, C. J. A. Cancer immunotherapy--revisited. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10,** 591–600 (2011).
3. 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).
4. 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).
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. Hoos, A. *et al.* Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin. Oncol.* **37,** 533–546 (2010).
8. Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* **21,** 233–240 (2009).
9. Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351,** 290–296 (1991).
10. Latouche, J. B. & Sadelain, M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat. Biotechnol.* **18,** 405–409 (2000).
11. 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).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. Rammensee, H.-G. & Singh-Jasuja, H. HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach. *Expert Rev. Vaccines* **12,** 1211–1217 (2013).
16. Dutoit, V. *et al.* Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain J. Neurol.* **135,** 1042–1054 (2012).
17. Neumann, A. *et al.* Identification of HLA ligands and T-cell epitopes for immunotherapy of lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **62,** 1485–1497 (2013).
18. Kowalewski, D. J. *et al.* HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112,** E166-175 (2015).
19. Berlin, C. *et al.* Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia* **29,** 647–659 (2015).

20. Seliger, B. *et al.* Identification and characterization of human leukocyte antigen class I ligands in renal cell carcinoma cells. *Proteomics* **11,** 2528–2541 (2011).
21. Löffler, M. W. *et al.* Personalized peptide vaccine induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2016.06.027
22. Kawakami, Y. *et al.* Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91,** 3515–3519 (1994).
23. Romero, P. *et al.* Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol. Rev.* **188,** 81–96 (2002).
24. Valmori, D. *et al.* Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multipeptide melanoma vaccine. *Cancer Immun.* **3,** 15 (2003).
25. Abdel-Wahab, Z. *et al.* Induction of anti-melanoma CTL response using DC transfected with mutated mRNA encoding full-length Melan-A/MART-1 antigen with an A27L amino acid substitution. *Cell. Immunol.* **224,** 86–97 (2003).
26. Abdel-Wahab, Z. *et al.* Cotransfection of DC with TLR4 and MART-1 RNA induces MART-1-specific responses. *J. Surg. Res.* **124,** 264–273 (2005).
27. Labarrière, N. *et al.* PBMC are as good a source of tumor-reactive T lymphocytes as TIL after selection by Melan-A/A2 multimer immunomagnetic sorting. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **57,** 185–195 (2008).
28. Linnebacher, M. *et al.* Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int. J. Cancer* **93,** 6–11 (2001).
29. 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).
30. 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).
31. 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).
32. 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).
33. Hunt, D. F. *et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255,** 1261–1263 (1992).
34. Derré, L. *et al.* A Novel Population of Human Melanoma-Specific CD8 T Cells Recognizes Melan-AMART-1 Immunodominant Nonapeptide but Not the Corresponding Decapeptide. *J. Immunol.* **179,** 7635–7645 (2007).
35. Valitutti, S., Müller, S., Cella, M., Padovan, E. & Lanzavecchia, A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375,** 148–151 (1995).
36. Kamata, Y. *et al.* Identification of HLA class I-binding peptides derived from unique cancer-associated proteins by mass spectrometric analysis. *Anticancer Res.* **33,** 1853–1859 (2013).
37. Schirle, M. *et al.* Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.* **30,** 2216–2225 (2000).
38. Gloger, A., Ritz, D., Fugmann, T. & Neri, D. Mass spectrometric analysis of the HLA class I peptidome of melanoma cell lines as a promising tool for the identification of

putative tumor-associated HLA epitopes. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **65,** 1377–1393 (2016).
39. Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Biomolecules* **4,** 994–1025 (2014).
40. Hanada, K.-I., Yewdell, J. W. & Yang, J. C. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* **427,** 252–256 (2004).
41. Michaux, A. *et al.* 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192,** 1962–1971 (2014).
42. Liepe, J. *et al.* A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science* **354,** 354–358 (2016).

A


ELAGIGILTV (M1m)
AAGIGILTV (M1)
RLSSCVPVA (FSP02)
MALPVTALLLPLALLLHASQA
LTR
SD
Ψ +
SA
hCD8αL
Peptide
IRES
puroR
LTR
M1
M
AAGIGILTV
P
1
27
35
118
Melanoma antigen MART-1
FSP02
RLSSCVPVA
C
1
152
156
164
186
wild-type part
mutated part
Isoform 1 of full length mutated protein TGFβR2 (V1)
1
127
131
139
161
Isoform 2 of full length mutated protein TGFβR2 (V2)

B

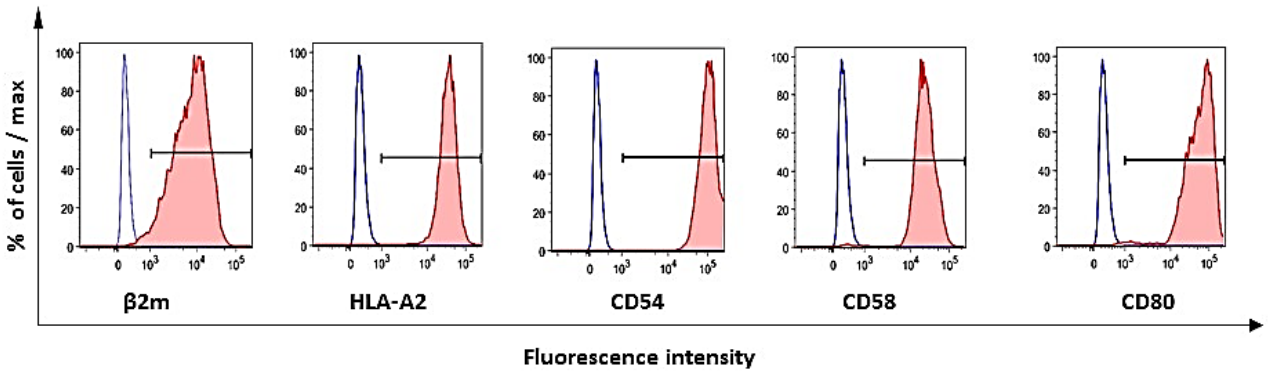

% of cells / max
β2m
HLA-A2
CD54
CD58
CD80
Fluorescence intensity

Figure 1

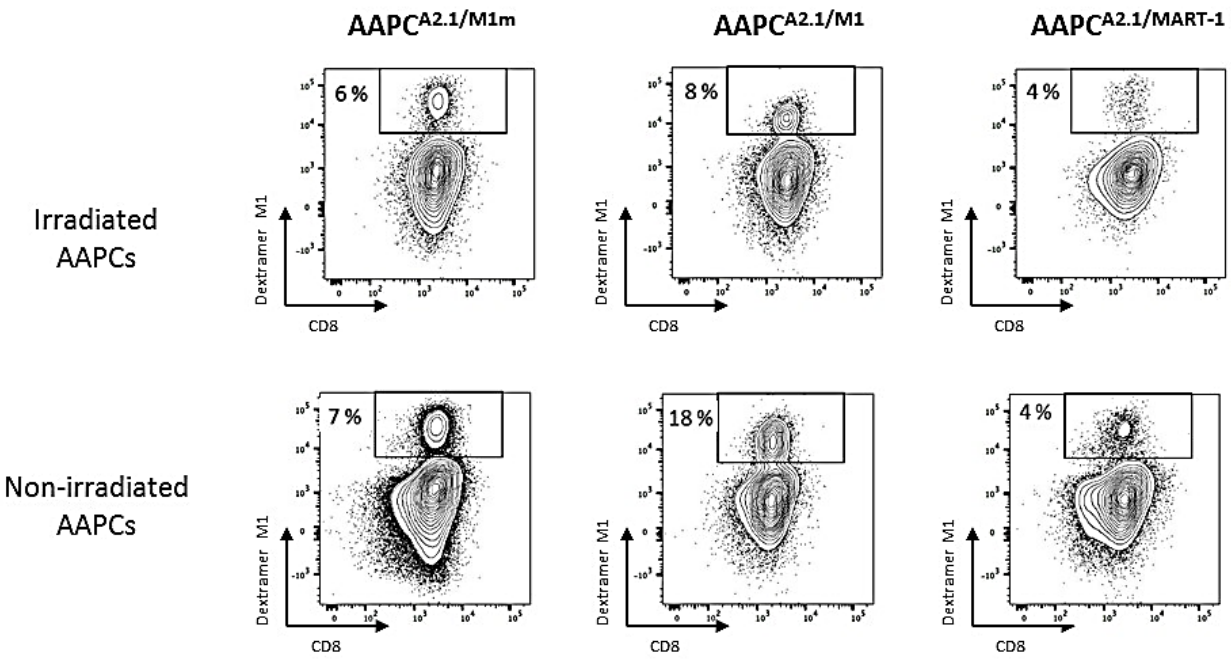
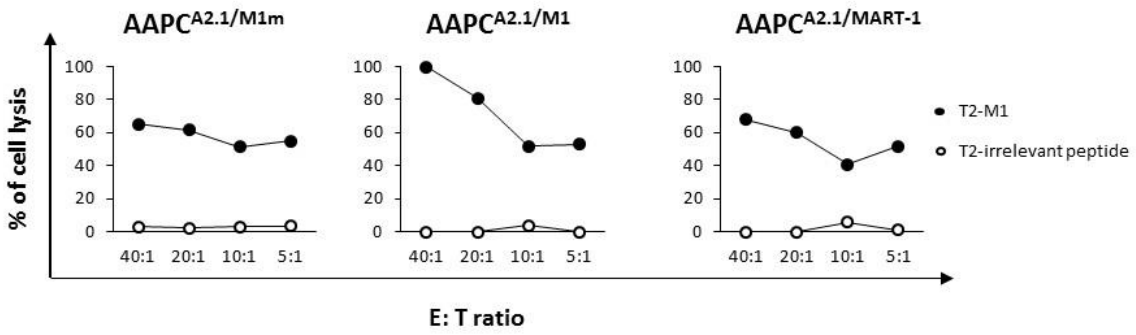

AAPC A2.1/M1m
AAPC A2.1/M1
AAPC A2.1/MART-1
Irradiated AAPCs
Non-irradiated AAPCs
6 %
8 %
4 %
7 %
18 %
4 %
Dextramer M1
CD8

Figure 2

A


AAPC^A2.1/M1m
AAPC^A2.1/M1
AAPC^A2.1/MART-1
% of cell lysis
100
80
60
40
20
0
40:1 20:1 10:1 5:1
T2-M1
T2-irrelevant peptide
E: T ratio

B

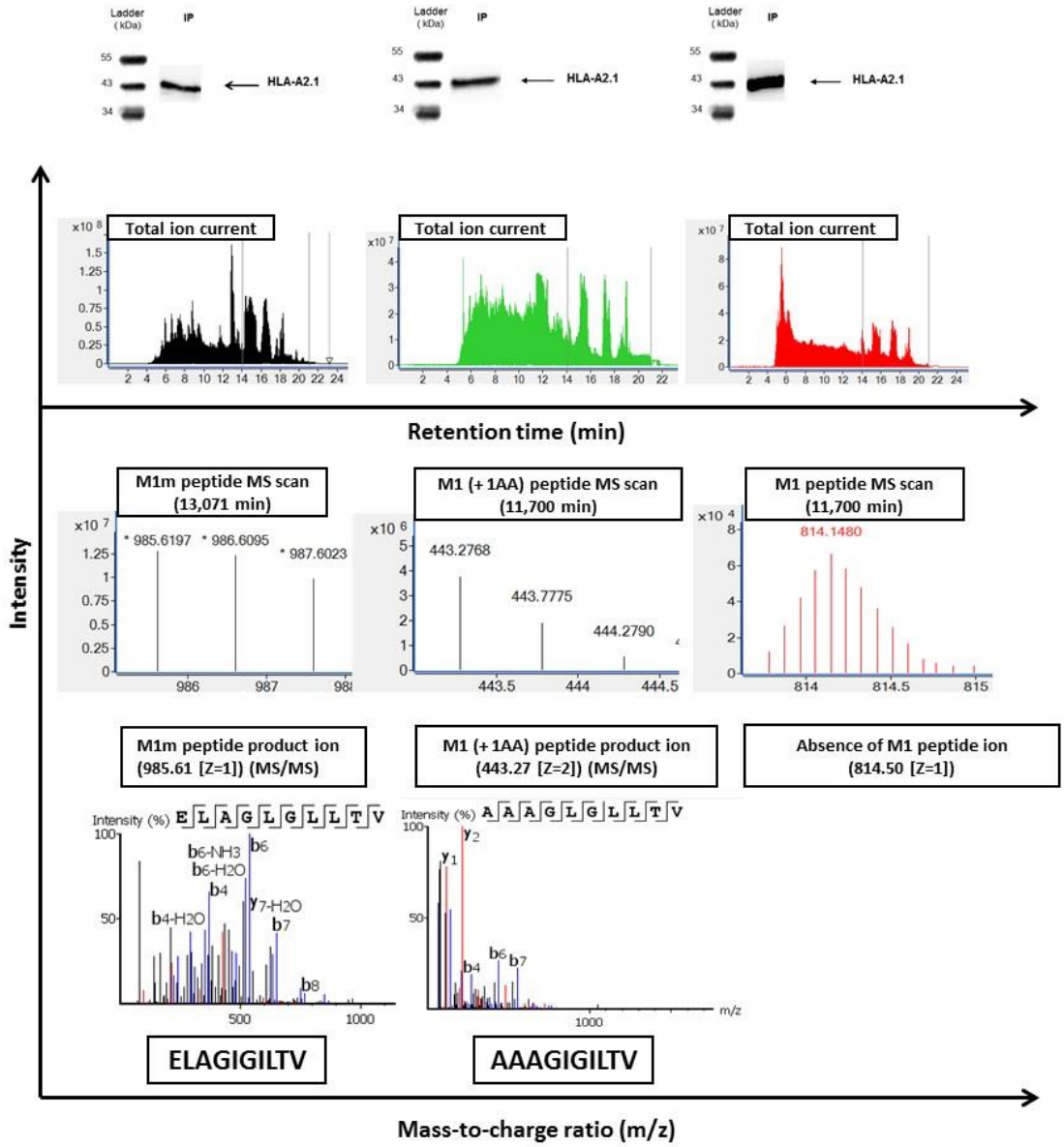

Ladder (kDa)
IP
55
43
34
HLA-A2.1
Total ion current
Retention time (min)
Intensity
M1m peptide MS scan (13,071 min)
* 985.6197
* 986.6095
* 987.6023
M1 (+ 1AA) peptide MS scan (11,700 min)
443.2768
443.7775
444.2790
M1 peptide MS scan (11,700 min)
814.1480
M1m peptide product ion (985.61 [Z=1]) (MS/MS)
M1 (+ 1AA) peptide product ion (443.27 [Z=2]) (MS/MS)
Absence of M1 peptide ion (814.50 [Z=1])
Intensity (%) E L A G L G L L T V
b6-NH3
b6-H2O
b6
b4
y7-H2O
b4-H2O
b7
b8
Intensity (%) A A A G L G L L T V
y2
y1
b4
b6
b7
m/z
ELAGIGILTV
AAAGIGILTV
Mass-to-charge ratio (m/z)

Figure 3

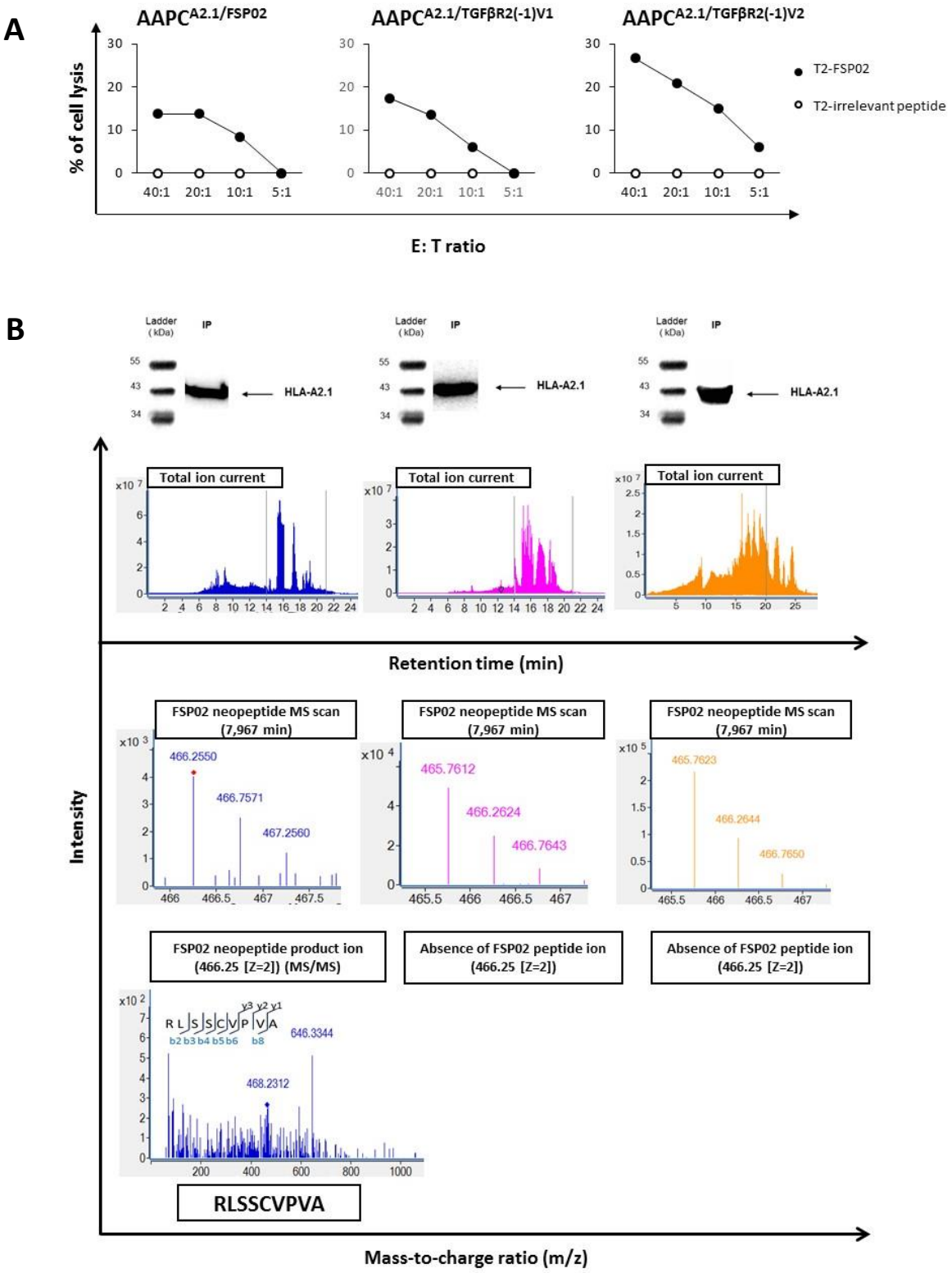

A
AAPC A2.1/FSP02
AAPC A2.1/TGFβR2(-1)V1
AAPC A2.1/TGFβR2(-1)V2
% of cell lysis
30
20
10
0
40:1
20:1
10:1
5:1
T2-FSP02
T2-irrelevant peptide
E: T ratio
B
Ladder (kDa)
IP
55
43
34
HLA-A2.1
Total ion current
x10 7
Retention time (min)
FSP02 neopeptide MS scan (7,967 min)
x10 3
466.2550
466.7571
467.2560
x10 4
465.7612
466.2624
466.7643
x10 5
465.7623
466.2644
466.7650
Intensity
FSP02 neopeptide product ion (466.25 [Z=2]) (MS/MS)
Absence of FSP02 peptide ion (466.25 [Z=2])
x10 2
R L S S C V P V A
b2 b3 b4 b5 b6 b8
y3 y2 y1
646.3344
468.2312
200
400
600
800
1000
RLSSCVPVA
Mass-to-charge ratio (m/z)

Figure 4

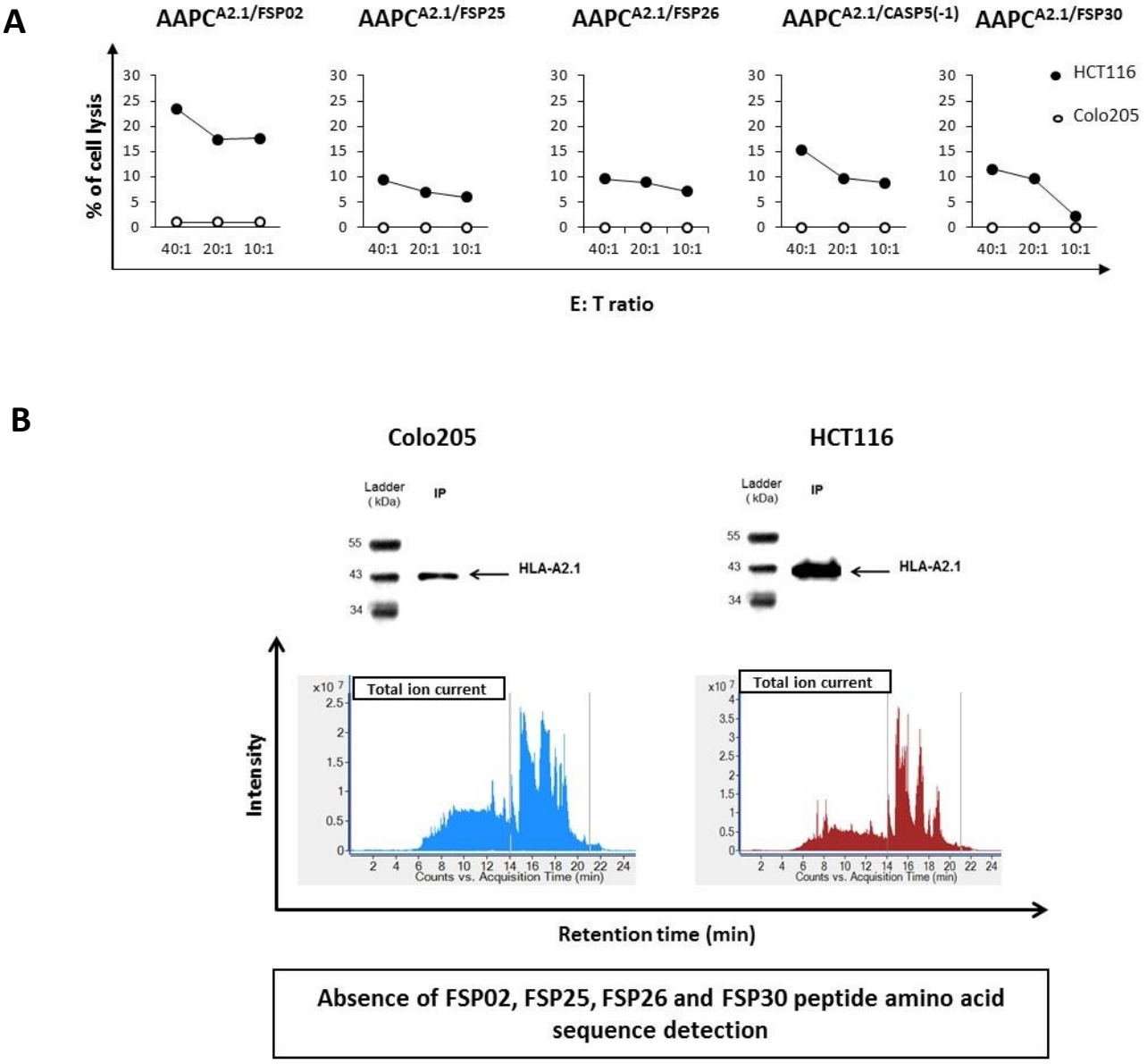
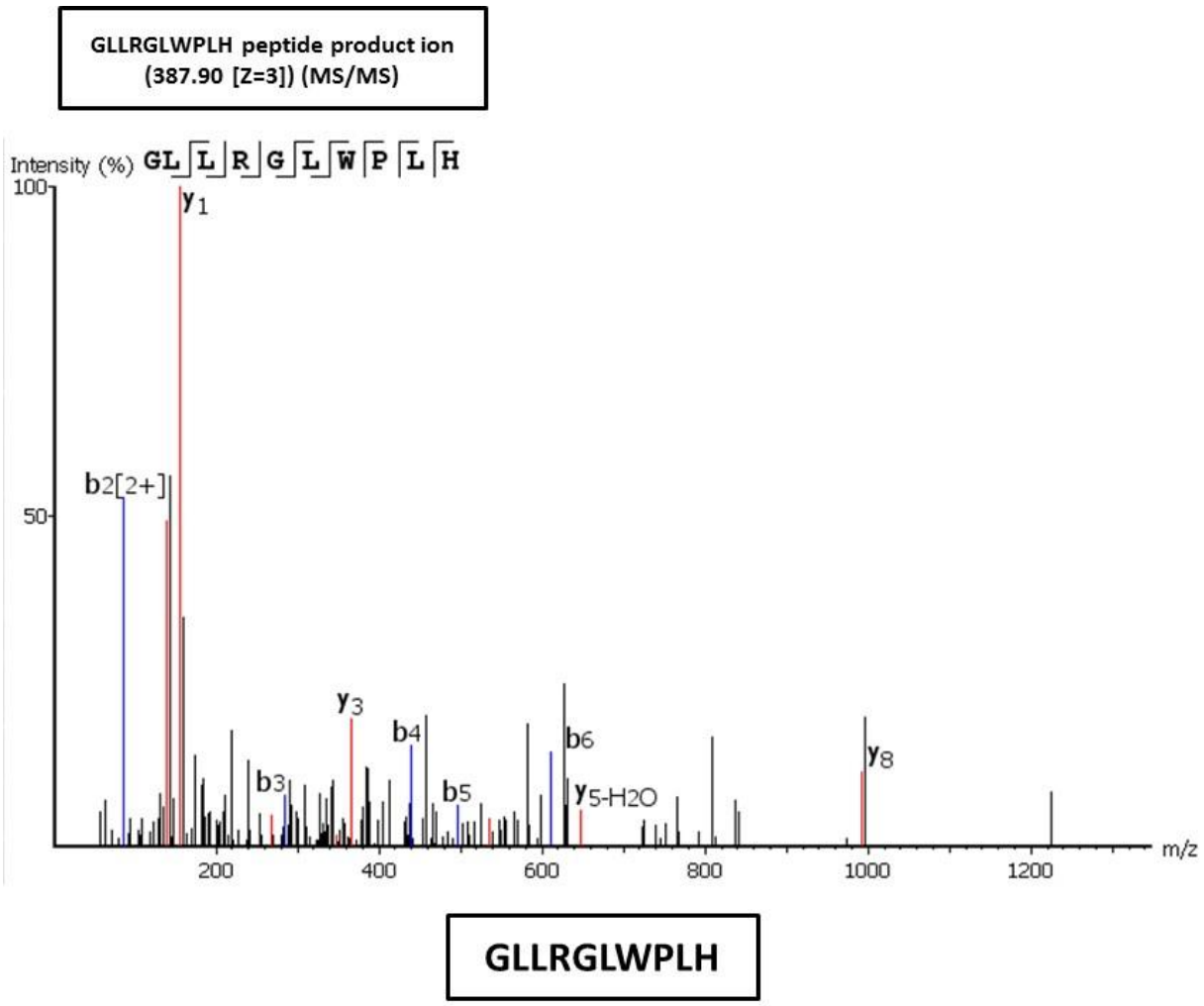
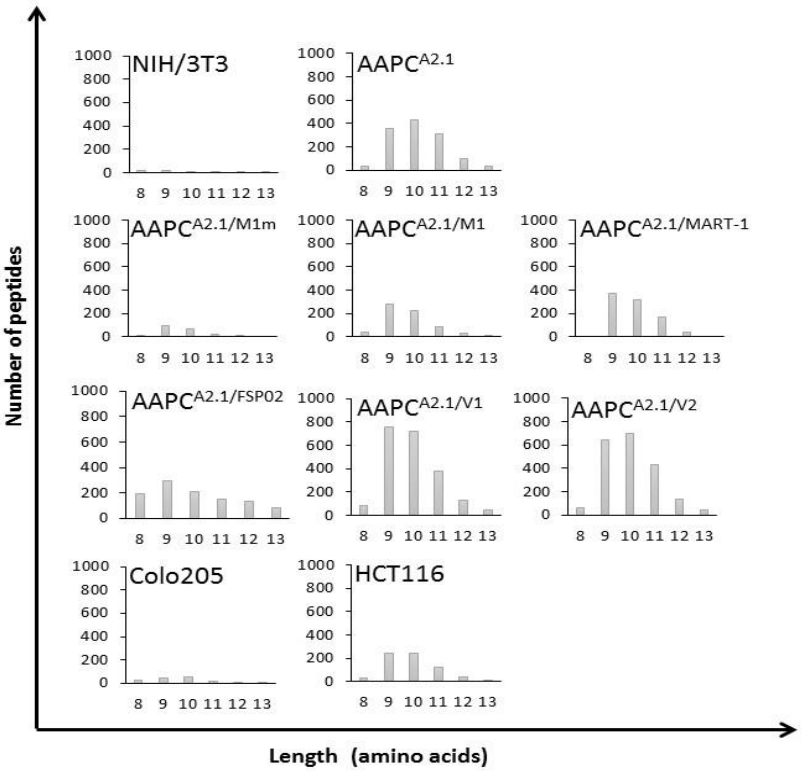

A
AAPC A2.1/FSP02
AAPC A2.1/FSP25
AAPC A2.1/FSP26
AAPC A2.1/CASP5(-1)
AAPC A2.1/FSP30
% of cell lysis
HCT116
Colo205
40:1 20:1 10:1
E: T ratio
B
Colo205
HCT116
Ladder (kDa)
IP
HLA-A2.1
Total ion current
Intensity
Counts vs. Acquisition Time (min)
Retention time (min)
Absence of FSP02, FSP25, FSP26 and FSP30 peptide amino acid sequence detection

Figure 5

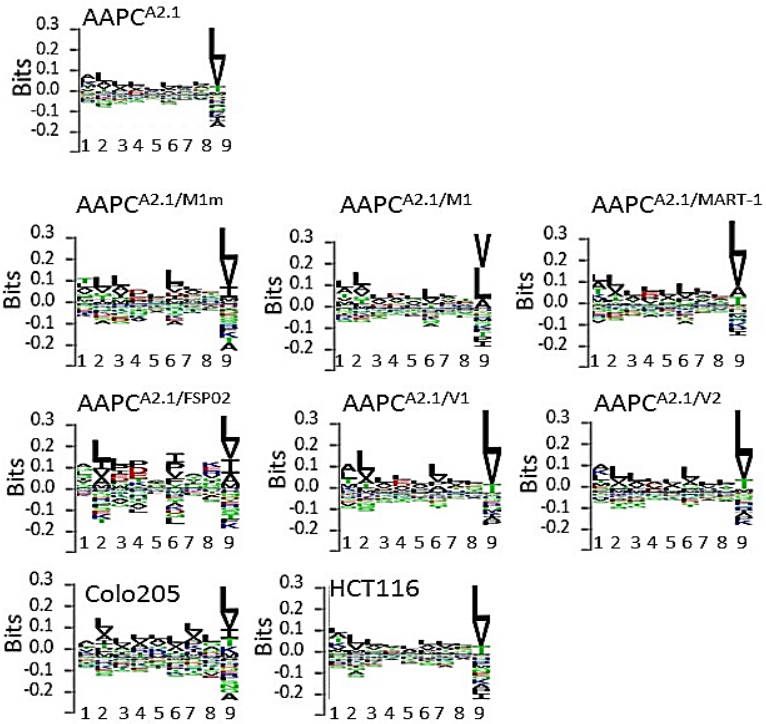


Supplementary data, Figure 1

A



B



Supplementary data, Figure 2

Figure 1: Artificial antigen presenting cell (AAPC) features

A, Each peptide or full length protein coding sequence was cloned in a non-replicative dicistronic gammaretroviral vector encoding a puromycin resistance element (puromycin-*N*-acetyltransferase, $puro^R$). Two types of vectors were obtained, the first type coding peptide (M1m, M1, or FSP02) fused to a signal peptide (human CD8α leader, hCD8αL), that targets the peptide into the endoplasmic reticulum and the second type coding a full length protein (MART-1 or mutated TGFβR2 proteins). Extended packaging signal (Ψ^+) allowed these plasmids to be integrated into viral particles after transfection into H29/293GPG packaging cells. (SD, splice donor site; SA, splice acceptor site). B, For each AAPC, expression profiles of HLA-A2, β2m, CD58, CD54 and CD80 molecules were assessed by flow cytometry. Example of $AAPC^{A2.1/M1m}$ shown. AAPCs were labeled with anti-CD54-FITC, anti-CD58-FITC, anti-CD80-FITC, anti-HLA-A2-FITC and anti-β2m-PE. The positivity threshold was set according to the control IgG (blue peak). β2m: β2 microglobuline; FITC: fluoresceine iso-thyo-cyanate; PE : phyco-erythrin

Figure 2: Irradiated and not irradiated $AAPC^{A2.1/M1m}$, $AAPC^{A2.1/M1}$ and $AAPC^{A2.1/MART-1}$ are able to activate efficiently M1 peptide specific T lymphocytes.

After stimulation with irradiated or not irradiated AAPCs ($AAPC^{A2.1/M1m}$, $AAPC^{A2.1/M1}$ and $AAPC^{A2.1/MART-1}$), M1 specific T lymphocytes were assessed by flow cytometry using APC-labeled dextamer M1 (y axis) and FITC-labeled anti-CD8 (x axis). The percentages of M1-dextramer positive cytotoxic T lymphocytes are indicated for each AAPC (control-dextramer staining were always lower than 0.1%).

Figure 3: Specific peptides were characterized by mass spectrometry, from AAPCs encoding M1m or M1 peptide ($AAPC^{A2.1/M1m}$ and $AAPC^{A2.1/M1}$) but not from AAPCs encoding full length MART-1 protein ($AAPC^{A2.1/MART-1}$).

A, Specific cytotoxic activity of healthy donor peripheral T lymphocytes. Specific lysis of T lymphocytes activated with $AAPC^{A2.1/M1m}$, $AAPC^{A2.1/M1}$ or $AAPC^{A2.1/MART-1}$ was evaluated using a standard ^{51}Cr release assay on T2 cells pulsed with irrelevant or M1 peptide at different effector to target (E:T) ratios. B, Mass spectrometry results. Immunoprecipitation (IP) of HLA-A2.1 complexes expressed by $AAPC^{A2.1/M1m}$, $AAPC^{A2.1/M1}$ or $AAPC^{A2.1/MART-1}$ was performed. Presence of HLA-A2.1 protein was validated by western blotting (upper panel). For $AAPC^{A2.1/M1m}$ (chromatograms on the left), the ion 985.61 (+1) with a retention

time of 13.071 minutes was extracted from total ion current chromatogram. For AAPC$^{A2.1/M1}$ (chromatograms in the middle), the ion 443.27 (+2) with a retention time of 11.700 minutes was extracted from total ion current chromatogram. For AAPC$^{A2.1/MART-1}$ (chromatograms on the right), the ion 814.50 (+1) with a retention time of 14 minutes was not found in total ion current chromatogram.

Figure 4: Specific peptides were characterized by mass spectrometry, from AAPCs encoding FSP02 peptide (AAPC$^{A2.1/FSP02}$) but not from AAPCs encoding full length TGFβR2 mutated proteins (AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ and AAPC$^{A2.1/ TGFβR2(-1)v2}$).

A, Specific cytotoxic activity of microsatellite unstable colorectal cancer patient peripheral T lymphocytes. Specific lysis of T lymphocytes activated with AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ or AAPC$^{A2.1/ TGFβR2(-1)v2}$ was evaluated using a standard ^{51}Cr release assay on T2 cells pulsed with irrelevant or FSP02 peptide at different effector to target (E:T) ratios. B, Mass spectrometry results. Immunoprecipitation (IP) of HLA-A2.1 complexes expressed by AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ or AAPC$^{A2.1/ TGFβR2(-1)v2}$ was performed. Presence of HLA-A2.1 protein was validated by western blotting (upper panel). For AAPC$^{A2.1/FSP02}$ (chromatograms on the left), the ion 466.25 (+2) with a retention time of 7.967 minutes was extracted from total ion current chromatogram. For AAPC$^{A2.1/TGFβR2(-1)v1}$ and AAPC$^{A2.1/ TGFβR2(-1)v2}$ (chromatograms in the middle and on the right), the ion 466.25 (+2) with a retention time of 7.967 minutes was not found in total ion current chromatogram of each of these AAPCs.

Figure 5: FSP02, FSP25, FSP26 and FSP30 neopeptides were not characterized by mass spectrometry, from HLA-A2.1^{+} microsatellite unstable colorectal cancer HCT116 cell line.

A, Specific cytotoxic activity of microsatellite unstable colorectal cancer patient peripheral T lymphocytes stimulated with AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/FSP25}$, AAPC$^{A2.1/FSP26}$, AAPC$^{A2.1/CASP5(-1)}$ or AAPC$^{A2.1/FSP30}$ was assessed in standard ^{51}Cr release assay on HLA-A2.1^{+} microsatellite unstable HCT116 and microsatellite stable Colo205 colorectal cancer cell lines, at different effector to target (E:T) ratios. B, Immunoprecipitation of HLA-A2.1 complexes was performed on HCT116 and Colo205 colorectal cancer cell lines. Presence of HLA-A2.1 protein was validated by western blotting (upper panel) experiment and immunoprecipitation

products of these cell lines were analyzed for detecting FSP02, FSP25, FSP26 and FSP30 peptide amino acid sequences.

Supplementary data

Figure 1: Decamer GLLRGLWPLH present in wild-type part of full length protein TGFβR2 (-1)v2 was detected and sequenced, from AAPCs encoding this protein.

Sequencing of the ion 387.90 (+3) extracted from the total ion current chromatogram of $AAPC^{A2.1/\ TGF\beta R2(-1)v2}$ was performed.

Figure 2 : A majority of the peptides obtained after immunoprecipitation of HLA-A2.1 complexes expressed by our AAPCs is 9 or 10 amino acid long and presents HLA-A2.1 principal anchor residues.

A, Amino acid length distribution (x axis) of peptides identified from NIH/3T3 cell line, all the different AAPCs, Colo205 and HCT116 cell lines. Numbers of detected peptides are indicated on the y axis. B, Principal anchor residues of HLA-A2.1 restricted nomamers were present in a majority of detected peptides. Each nonamer characterized from all the different AAPCs, Colo205 and HCT116 cell lines, was analysed using Seq2Log 2.0 algorithm. Principal amino acids at the different positions are presented for each cell line. Similar results were obtained with decamers.

Partie II : Stimulation *in vitro* « personnalisée » de LTC anti-tumoraux, basée sur l'utilisation de CPAA codant des peptides prédits, potentiellement dérivés de néoantigènes spécifiques de la tumeur, chez des patients atteints de CCR à IMS

I. Contexte scientifique

Dans les CCR à IMS, la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur associés à un meilleur pronostic a été rapportée par Sinicrope *et al.*[97]. Effectivement, dans ces CCR à IMS, il a été trouvé un plus grand nombre de lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ actifs et un pourcentage plus important de cellules cancéreuses subissant l'apoptose. De plus, les cellules apoptotiques étaient majoritairement localisées à proximité des cellules $CD8^+$, suggérant que ces LTC seraient capables d'éliminer ces cellules tumorales[390]. La réaction inflammatoire marquée et le meilleur pronostic associés aux CCR à IMS pourraient donc être expliqués par le statut particulier de ces tumeurs dans lesquelles des néoantigènes spécifiques des cellules cancéreuses sont observés. De nombreuses données sont disponibles dans la littérature sur l'infiltrat T et le pronostic, mais peu de données étaient disponibles sur le lien entre cet infiltrat T et les mutations *frameshift* à l'origine des néoantigènes potentiellement ciblés par les LT.

Au laboratoire, une série de 61 patients atteints de CCR à IMS nous a permis d'étudier la corrélation entre les mutations *frameshift* et l'infiltrat de LT $CD3^+$. Chez ces patients, une analyse simultanée de 19 gènes cibles de l'IMS, par PCR multiplexes fluorescentes, et un immunomarquage CD3 des LT infiltrants ont été effectués. Cette étude a permis de montrer qu'il y avait une corrélation entre le nombre et le spectre de mutations *frameshift* et la densité des LT totaux infiltrant les tumeurs. Dans une étude plus récente, réalisée avec un nombre plus important de patients (103 patients) atteints de CCR à IMS, l'étude de deux autres marqueurs lymphocytaires, CD8 et FOXP3 en plus de CD3, a été effectuée en utilisant des puces tissulaires (*TMA, Tissue Microarray*) permettant des marquages immunohistochimiques à grande échelle. Nous avons pu établir dans cette étude une corrélation entre la densité de LT infiltrants $CD8^+$ et le nombre et le spectre des mutations *frameshift*. Nous avons également réussi à monter *in vitro* des réponses T $CD8^+$ anti-tumorales spécifiques de néopeptides dérivés de mutations *frameshift* présentes dans leur tumeur chez des patients HLA-$A2.1^+$. Ces résultats fournissent des arguments en faveur du développement de nouvelles stratégies

d'immunothérapie spécifique chez les patients atteints de CCR à IMS. Nous avons voulu étudier plus précisément la réponse immunitaire spécifique des néopeptides exprimés dans la tumeur de patients atteints de CCR à IMS dans le contexte de la molécule HLA-A2.1, la plus fréquente dans la population caucasienne. Il était donc nécessaire d'identifier les néopeptides les plus immunogènes, potentiellement présentés par la tumeur, qui pourraient être la cible d'une réponse T CD8 spécifique. Pour cela, dans cette étude, nous avons utilisé une approche d'immunologie inverse pour identifier les néopeptides HLA-A2.1-restreints potentiellement immunogènes. Cette approche est basée sur l'utilisation d'algorithmes de prédictions bioinformatiques. Une fois identifiés, l'immunogénicité de ces néopeptides a été testée par coculture de LT de patients HLA-A2.1^{+} avec des CPAA codant ces néopeptides.

Chez deux patients sur trois HLA-A2.1^{+} atteints de CCR à IMS, une mutation *frameshift* du gène *CASP5* a été retrouvée. Cette mutation résulte de la perte d'une adénine (-1) dans une séquence codante de 10 adénines ($(A)_{10}$) du gène *CASP5*. Les protéases de la famille des caspases sont liées à la fois à la mort cellulaire programmée et à des réponses immunitaires et inflammatoires[433]. La caspase-5 sauvage est étroitement liée à la caspase-4 et à la caspase-1, et ces trois caspases constituent la sous-famille de la caspase-1-*like*[433]. Ce complexe clive la pro-caspase-3 en sa forme active, la caspase-3. La caspase-4 et la caspase-3, en réponse à des signaux de mort, peuvent conduire la cellule à l'apoptose. La caspase-1 clive la pro-interleukine 1β en interleukine 1β et permet aussi l'induction d'IFN-γ, deux cytokines importantes pour la réponse inflammatoire. La mutation de la caspase-5 pourrait donc jouer un rôle dans la progression des tumeurs. En effet, l'inhibition de l'une ou l'autre voie (apoptotique ou inflammatoire) pourrait entraîner la prolifération des cellules mutées. De plus, cette mutation est fréquente puisqu'elle a été retrouvée dans 60% des CCR à IMS[413,414]. Au-delà de cet argument de fréquence, l'étude de cette mutation a été en plus motivée par des observations faites chez les patients porteurs de la mutation *CASP5* (-1). En effet, dans un groupe de patients portant cette mutation, plus de décès ont été observés, suggérant que la survie était moins bonne en présence de cette mutation.

En utilisant quatre logiciels de prédiction différents, les peptides KMFFMVFLI (FSP25) et FLIIWQNTM (FSP26) ont été prédits comme étant des peptides HLA-A2.1 restreints, pouvant être issus de la dégradation par le protéasome du néoantigène CASP5 (-1). L'immunogénicité de ces peptides a été testée *in vitro* par coculture de LT du sang périphérique des trois patients HLA-A2.1^{+} atteints de CCR à IMS de cette étude avec des cellules présentatrices d'antigène artificielles exprimant ces peptides. FSP25 a été identifié

comme plus immunogène que FSP26 dans des tests de cytotoxicité et de sécrétion d'IFN-γ. De façon importante, des LT activés avec des CPAA codant le peptide FSP25, le peptide FSP26 ou la protéine entière CASP5 mutée étaient en mesure de lyser spécifiquement une lignée cellulaire humaine HLA-$A2^+$ dérivée d'un CCR à IMS. La protéine caspase-5 mutée étudiée ici et les épitopes qui en dérivent, dans le contexte HLA-A2, pourraient être des cibles thérapeutiques d'intérêt majeur pour une stratégie d'immunothérapie spécifique personnalisée dans le cadre de CCR à IMS exprimant ce néoantigène.

.

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

ORIGINAL ARTICLE (manuscript in preparation)

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

Hafid Kora[1], Sami Gouas[1], Pauline Maby[1] Estelle Dupel[1], Alexandre Couture[1], Jacques Mauillon[2], Nathalie Parodi[2], Jérôme Leprince[3], Thierry Frébourg[1, 2], Jean-Baptiste Latouche[1,2]

[1]Inserm U1079, Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB), Rouen University, Normandy Centre for Medical Genomics and Personalized Medicine, Rouen, France;

[2]Department of Genetics, Rouen University Hospital, Rouen, France

[3]Inserm U982, IRIB, Rouen University, Mont-Saint-Aignan, France;

Corresponding Author: *Jean-Baptiste Latouche, INSERM U1079, 22 boulevard Gambetta, 76083 Rouen Cedex, Rouen, France. Phone: 33(0)232880397; Fax: 33(0)235148237; Mail: jean-baptiste.latouche@chu-rouen.fr*

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.

The authors disclose no potential conflict of interest.

Abstract

Colorectal cancers (CRCs) with microsatellite instability (MSI) represent around 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 lead to the synthesis of immunogenic neoantigens, presented as neopeptides on HLA class I molecules and targeted by specific cytotoxic T cell responses. These neoantigens could be used as therapeutic targets in MSI CRCs. We developed a personalized specific immunotherapy strategy based on the *in vitro* stimulation of given patients' cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against a neoantigen derived from a *CASP5*(-1) frameshift mutation detected in their tumors.

Methods: To detect tumor mutations in MSI CRC patients, 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, on HLA-A2.1, the most frequently expressed HLA-I molecule, a transgene-encoded peptide or peptides derived from a transgene-encoded full length protein.

Results: We first found in a cohort of 71 MSI CRC patients that *CASP5*(-1) frameshift mutation was associated with a less good prognosis. This single nucleotide deletion in *CASP5* gene could lead to the synthesis of an immunogenic CASP5 mutated protein, and two neopeptides, FSP25 and FSP26, derived from this neoantigen, were predicted to be presented on the HLA-A2.1 molecule. $A2.1^+$ AAPCs expressing each one of these neopeptides or the full length CASP5 mutated protein could stimulate and expand FSP-25- and FSP-26-specific peripheral CTLs from $HLA\text{-}A2^+$ MSI CRC patients whose tumor cells harbored the mutation. FSP25 was more immunogenic than FSP26 *in vitro* in cytotoxicity and IFN-γ secretion assays. Importantly, anti-tumor activity of activated CTLs was proven by specific lysis of $HLA\text{-}A2.1^+$ MSI CRC cell line HCT116 harboring the *CASP5*(-1) frameshift mutation.

Conclusions: These preclinical data showed that the *CASP5*(-1) frameshift mutation was associated with a less god prognosis, and that FSP25 and FSP26 neopeptides, derived from the CASP5(-1) neoantigen, in the HLA-A2.1 context, might be therapeutic targets of major interest for a personalized specific immunotherapy strategy in the context of MSI CRCs, especially young Lynch patients, expressing the neoantigen.

Keywords: neoantigen; neopeptide; Caspase 5; cytotoxic T lymphocyte; 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 year[1–3]. 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 individuals[4].

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 CRCs[5–10]. 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 antibody[5]. 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 in microsatellite stable (MSS) and MSI CRC patients, highlighting a clear benefit in MSI CRC patients[11]. 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 defective[15]. 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

TLs *in vitro*[16] and could 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 CRCs[17]. 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 team[21]. 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 molecule[21]. Such AAPCs have already been shown to efficiently present transgene-encoded FSPs, but also degrade transgene-encoded full length antigens and present them in the form of immunogenic peptides to human TLs, like autologous cells[17,22–24]. Thus, these cells constitute a unique tool to obtain clinically relevant specific TLs and confirm the immunogenicity of predicted peptides or of 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 the patient tumors[17]. Several genes containing short repeated sequences are frequently mutated in MSI CRCs. In this study, we were particularly interested in *caspase-5* (*CASP5)* gene, which is 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 FSP26[27]. 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 death[28] and immune and inflammatory responses, and *CASP5* 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)

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

mutated MSI CRC patients. With our AAPCs, we have shown that FSP25 and FSP26 neopeptides were immunogenic in such patients, FSP25 being more immunogenic than FSP26 *in vitro*. 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 MSI CRC patients, especially 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 somatic tumor genetics laboratory using Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega, Charbonnieres, 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 MSI

CRC 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 an 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 cDNA 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 in this study. 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 websites[29–31].

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^{+} immune synapse (AAPC$^{A2.1}$): human β2-microglobulin, 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 by Eurogentec® (Kaneka Corporation, Liège, Belgium), were cloned downstream of a sequence derived from the human CD8α leader, in a replication defective gamma-retroviral dicistronic SFG vector encoding a puromycin resistance element. Insert encoding the mutated CASP5 full length protein deleted of one adenine (A) in a 10 A homopolymeric track, was synthesized by GeneArt® (LifeTechnologies, Regensburg, Germany) gene synthesis service. This sequence was cloned in the same type of vector. As previously described[21], 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 $AAPC^{A2.1}$. $AAPC^{A2.1/FSP25}$ (expressing FSP25 peptide), $AAPC^{A2.1/FSP26}$ (expressing FSP26 peptide) and $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$ (expressing mutated CASP5 full length neoprotein), were then selected with puromycin (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) at 10 µg/ml for two weeks. $AAPC^{A2.1/M1m}$ expressing a modified peptide derived from MART-1, autoantigen overexpressed in melanoma, have already been described[22].

Cell culture

$AAPC^{A2.1/M1m}$, $AAPC^{A2.1/FSP25}$, $AAPC^{A2.1/FSP26}$ 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 (penicillin, 100 UI/mL, and streptomycin, 10 µg/ml, ThermoFisher Scientific) were added in all culture media.

Flow cytometry

To determine their phenotype, cells were washed and resuspended in PBS with 0.1% BSA (Bovine 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, AAPC 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 β2-microglobulin-PE (phycoerythrin), CD54-PE, CD58-FITC, and CD80-FITC antibodies from ThermoFisher Scientific as recommended by the manufacturer.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors and MSI CRC patients were used with their informed consent and upon agreement of the local ethic committee. For each donor, PBMCs from a 4 ml blood sample were collected by density centrifugation on a lymphocyte separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France) and stained with anti-HLA-A2-FITC, to check their HLA-A2 status by flow cytometry on a FACSCanto. Three HLA-$A2^+$ patients and three HLA-$A2^+$ healthy donors could be included in this study.

Peripheral T lymphocyte *in vitro* stimulation with AAPCs

For these three HLA-$A2^+$ patients and three HLA-$A2^+$ healthy donors, the day before stimulation, PBMCs from 15 to 40 ml blood samples 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 deposited (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 7^{th} day of coculture.

Cytotoxicity assays

Cytotoxic activity of the stimulated TLs was assessed in standard ^{51}Cr release assays, as previously described[33]. All target cells were HLA-A*0201^+ cells. T2 cells (ATCC) were loaded with different peptides (irrelevant, M1m, FSP25 or FSP26, synthesized by Rouen University Proteomics 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 molecule 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 TLs obtained after co-culture using Elispot (Enzyme-linked immunospot) assays

Elispot assays were performed, using a human IFN-gamma ELISPOT Ready-SET-GO Kit (Affymetrix eBioscience, Santa Clara, California). Briefly, nitrocellulose 96-well plates (Multiscreen, Millipore, Bedford, MA) were covered with anti-human IFN-γ capture antibody (Affymetrix eBioscience), blocked the next day with RPMI (ThermoFisher Scientific) medium containing 10% FCS (ThermoFisher Scientific) at room temperature for 1 hour. TLs (10^5 per well) were plated in triplicates with T2 cells (5,000 per well) loaded with different peptides (irrelevant, M1m, 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 hours and washed. Plates were then incubated with avidin-HRP reagent (eBioscience Affymetrix) for 45 minutes, and washed. Spots were detected by incubation (1 minute 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 was obtained by subtracting the number of spots obtained under the control conditions (T2 loaded with irrelevant peptide) from the number of spots obtained under the specific conditions (T2 loaded with M1m, FSP25 or FSP26).

Results

CASP5(-1) frameshift mutation in MSI CRCs is associated with a less good prognosis.

Kaplan-Meier survival curves were obtained from 71 MSI CRC patients already studied[17], subdivided in two groups. The first group was composed of 22 MSI CRC patients with no *CASP5*(-1) frameshift mutation found in their tumor. The second group was composed of 49 MSI CRC patients with *CASP5*(-1) frameshift mutation. In this second group, more deaths (25%) than in the first group (9%) were observed. Using a non-parametric Log Rank statistical test, we could show that survival of MSI CRC patients presenting this *CASP5*(-1) mutation was significantly lower ($p = 0.0419$) than the one of MSI CRC patients with no *CASP5*(-1) frameshift mutation (Figure 1).

Construction of AAPCs encoding CASP5 neoantigen-derived FSP25 or FSP26 peptide or full length CASP5 neoantigen

Among the eight MSI CRC patients who agreed to be involved in our preclinical study, three were HLA-$A2^+$ (phenotype obtained in the laboratory, 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-resticted peptides that were specific of a given patient's tumor. We have developed three multiplex PCRs to detect frameshift mutations in 29 genes (list of genes and primers available upon request) containing repeated coding sequences[17,25]. These genes had been selected because their mutations in MSI CRCs are known to be frequent, involved in carcinogenesis or immunogenic[25]. In patient 1 (P1) who had an adenoma, no CASP5 mutation was detected. We found a frameshift mutation of *CASP5* gene present in tumors of patients 2 and 3 (P2 and P3), as a shift of the fluorescence peak (Figure 3), indicating a deletion of one nucleotide (-1A) in the tumor DNA sequence, was observed. The mutation was present in 13% and 98% of the tumor cells of P2 and P3 primary tumors. The putative mutated protein amino acid sequence was obtained *in silico*. Then, we selected the nonapeptides, in the mutated part of CASP5(-1) protein, with the highest affinity scores for the HLA-A*0201 molecule, given by 4 different prediction website algorithms[31]. CASP5(-1) putative neoprotein contained the neopeptides KMFFMVFLI and FLIIWQNTM, respectively called FSP25 and FSP26[27], with SYFPEITHI HLA-A*0201 binding score predictions of 21 and 20, and the overall highest scores with the 4 algorithms. It was verified by "blasting" that these peptides did not match with any "normal" human

peptide. AAPC$^{A2.1}$ encoding FSP25, FSP26 and full length CASP5(-1) protein were then constructed. FSP 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, β2-microglobulin, CD54, CD58 and CD80 transmembrane molecules by artificial antigen presenting cells was always observed by flow cytometry after transduction with the FSP25, FSP26 or CASP5(-1) construct (Figure 2B).

***CASP5*(-1) frameshift mutation-derived peptide-specific CTLs can be obtained in patients whose tumors harbor the mutation.**

Peripheral TLs of each patient and of three HLA-A2$^+$ healthy donors involved in this study were co-cultured 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 a modified peptide derived from MART-1, autoantigen overexpressed in melanoma (M1m) of high affinity for HLA-A2.1. We have already shown, in previous works[17,33], the ability of AAPC$^{A2.1/M1m}$ to activate TLs directed against M1m peptide in all tested HLA-A2$^+$ donors, and these AAPCs were used in this study to make sure specific CTLs could be obtained with our system from our three patients. As assessed in standard ^{51}Cr release assays, after one stimulation with the different AAPCs, P1 and healthy donor peripheral CTLs were able to specifically lyse T2 cells pulsed with M1m peptide, but not T2 cells pulsed with FSP25 or FSP26 peptide (Figure 3). For P2, after one stimulation, a specific lysis of M1m peptide-pulsed T2 cells (up to 18% at 40:1 E/T ratio) was observed for TLs cultured with AAPC$^{A2.1/M1m}$. Specific lysis of FSP25 neopeptide-pulsed T2 cells was also observed for TLs cultured with AAPC$^{A2.1/FSP25}$. Maximum specific lysis was 12% at 40:1 E/T ratio, and minimum specific lysis was 7% at 10:1 E/T ratio. No significant cytotoxicity was obtained against the FSP26 neopeptide for TLs cultured with AAPC$^{A2.1/FSP26}$, or against the FSP25 and FSP26 neopeptides for TLs cultured with AAPC$^{A2.1/CASP5(-1)}$ (Figure 3). For P3, after one stimulation, a specific lysis of M1m peptide-pulsed T2 cells (up to 40 % at 40:1 E/T ratio) was observed for TLs cultured with AAPC$^{A2.1/M1m}$. Specific lysis of FSP25 neopeptide-pulsed T2 cells was observed for TLs cultured with the AAPC$^{A2.1/FSP25}$. Maximum specific lysis was 18% at 40:1 E/T ratio, and minimum specific lysis was 10% at 10:1 E/T ratio. Specific lysis of FSP25 neopeptide-pulsed T2 cells was also observed for TLs cultured with AAPC$^{A2.1/CASP5(-1)}$, although at a lower level. Maximum specific lysis was 10% at 40:1 E/T ratio, and the minimum specific lysis was 7% at 10:1 E/T ratio. Moderate cytotoxicity was obtained against the FSP26 neopeptide with TLs cultured with the AAPC$^{A2.1/FSP26}$ and AAPC$^{A2.1/CASP5(-1)}$ (Figure 3).

FSP25- and FSP26-specific CTLs produce IFN-γ in a specific manner.

As P3 had the best responses, studies were completed for this patient with analysis of TL IFN-γ secretion. As expected, high specific secretion of IFN-γ was observed for P3's TLs cultured with $AAPC^{A2.1/M1m}$. The number of spots after background subtraction was 290 (Figure 4). A specific secretion of IFN-γ was observed for TLs cultured with $AAPC^{A2.1/FSP25}$ and $APC^{A2.1/CASP5(-1)}$, against FSP25 neopeptide. The numbers of spots after background subtraction were respectively 50 and 120 (Figure 4). A specific secretion of IFN-γ was also observed for TLs cultured with $AAPC^{A2.1/FSP26}$ and $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$, against FSP26 neopeptide. The number of spots after background subtraction were respectively 7 and 50 (Figure 4).

FSP25- and FSP26-specific CTLs are cytotoxic against HLA-A2.1$^+$ *CASP5*(-1) mutated MSI CRC cell line HCT116.

CASP5(-1) mutation was found in HLA-A2.1$^+$ MSI CRC cell line HCT116 genomic DNA by multiplex PCR (Figure 5A). *CASP5*(-1) mutation was also found by RT-PCR after HCT116 mRNA extraction and cDNA sequencing (data not shown). Importantly, peripheral P3 CTLs stimulated with $AAPC^{A2.1/FSP25}$, $AAPC^{A2.1/FSP26}$ and $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$ did not lyse HLA-A2.1$^+$ MSS CRC cell line Colo205 (Figure 5B) but specifically lysed HLA-A2.1$^+$ MSI CRC cell line HCT116 (up to 15 % at 40:1 E/T ratio).

Discussion

During repeat sequence replication, DNA polymerase sometimes integrates a wrong number of nucleotides. Normally these mistakes are detected by the mismatch repair (MMR) system to be fixed. In colorectal cancers (CCRs) with microsatellite instability (MSI) a defect in this MMR system leads to an accumulation of frameshift mutations that result in the synthesis of tumor-specific neoantigens. In order to develop a personalized immunotherapy approach, this preclinical project consisted initially in characterizing the frameshift mutations present in the tumor of a given HLA-A2.1^{+} MSI CRC patient, then, in a second step, in stimulating TLs from the peripheral blood of this patient against neopeptides resulting from these mutations, and finally, in a third step, in checking the specific cytotoxic activity of the stimulated TLs against CRC cells. To efficiently stimulate CTLs against tumor antigens, for the future development of specific adoptive cellular immunotherapy or vaccine therapy strategies, artificial antigen presenting cells (AAPCs) have been developed by our team[21]. We have already demonstrated that our AAPCs were capable not only of effectively presenting transduced peptides but also of fragmenting transduced proteins into immunogenic peptides presented within the HLA-A2.1 groove[17,23,24,32,33]. Previously, we also designed three multiplex PCRs to detect frameshift mutations in 29 genes containing repeated coding sequences[17,25]. With these multiplexes, we identified in a precedent study[17,25] different frameshift mutations present in the tumors of three Lynch syndrome patients. Using prediction algorithms, we had selected three neopeptides with 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 had 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 lyse 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 MSI CRC patients, in particular Lynch syndrome young patients, a personalized specific immunotherapy strategy targeting antigens expressed by their tumor cells.

Following this very encouraging work, frameshift mutations were looked for in three new HLA-A2^{+} patient tumors. In the first patient, PCR multiplex analysis revealed an absence of frameshift mutations, despite MSI detection. As this patient had an adenoma, this suggests that MMR defect is first detectable in (non coding) microsatellites, probably because of the

length of these repeated sequences. Since MSI was present in his adenoma, this suggests that, over time, mutations in the repeated coding sequences can accumulate and that some of them may be at the origin or involved in the malignant transformation of MSI adenoma. In the other two patients' tumors, several genes, including *CASP5*, were mutated. The *CASP5* mutation we detected was a deletion of one adenine (A) contained in a repeated coding sequence of 10 A. The *CASP5* gene is involved in inflammatory response and apoptosis, and its mutation could play an important role in tumor progression. This mutation was found in 60% of all tested MSI CRCs[17,25]. The major argument that led us to more specifically study this mutation in these three new patients was that survival was affected by this mutation in a cohort of 71 patients already studied before[17]. As seen on the Kaplan-Meier survival curves, in *CASP5*(-1) mutated patient group, more deaths were observed. A non-parametric Log Rank statistical test confirmed that survival of *CASP5*(-1) mutated MSI CRC patients was significantly lower ($p = 0.0419$) compared to MSI CRC patients without this mutation. Our hypothesis is that the presence of the mutation in the patients' tumors could, to a certain extent, render the tumor cells resistant to apoptosis. It would therefore be interesting to develop new therapeutic approaches for the *CASP5*(-1) mutated MSI CRC patients such as the administration of pro-apoptotic or anti-apoptotic inhibitor molecules, as already reported in chronic myeloïd leukemia[34], or the activation of anti-tumor CASP5(-1) neoantigen-specific TLs. However, for a therapeutic strategy based on the activation of specific TLs, it is necessary to take into account the fact that the identified frameshift mutations could lead to NMD (Nonsense mediated mRNA decay). NMD is a "quality control" leading to the degradation of mRNA containing a premature stop codon more than 50-55 nucleotides upstream of the last exon-exon junction[35]. The transcription of the *CASP5*(-1) mutated gene generates mRNA containing a premature stop codon before the last exon, the degradation of which is predicted. But it has already been shown that there could be resistance to NMD and that it could even be inhibited[36]. Moreover, *CASP5*(-1) mutation is already known to lead to the generation of FSP26 neopeptide, described as immunogenic[27]. In our study, in order to characterize the possible neopeptides derived from the *CASP5*(-1) mutation, we analyzed the protein sequence of the mutated CASP5 with four different prediction softwares (SYFPEITHI, BIMAS, Rankpep and NetMHC). These softwares predicted the KMFFMVFLI and FLIIWQNTM peptides as HLA-A2.1-restricted peptides which may be derived from the mutated CASP5 protein. Thanks to the nomenclature of Prof. M. Von Knebel Doeberitz, we could see that these peptides had already been studied and corresponded respectively to the peptides FSP25

and FSP26. These FSPs do not exhibit homology with any autoantigen. The different phenomena of immune tolerance are therefore certainly less important for these FSPs, derived from a neoantigen, expressed only by the tumor cells, than for peptides derived from autoantigen. FSP25 and FSP26 epitopes, resulting from the *CASP5*(-1) 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 FSP25 ($AAPC^{A2.1/FSP25}$), FSP26 ($AAPC^{A2.1/FSP26}$) or full length CASP5 neoantigen ($AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$) were then constructed. In all tested healthy donors and patients, specific lysis of M1m peptide-pulsed cells could be obtained with $AAPC^{A2.1/M1m}$, confirming the previous results of the team, and assuring us of the quality of our cocultures[33]. As expected, no specific lysis of FSP25- or FSP26-pulsed cells was observed for the three healthy donors. This can be explained by the fact that the cells of these healthy donors did not harbor the *CASP5*(-1) mutation. FSP25- and FSP26-specific CTLs potentially present in these healthy donors are therefore naïve TLs that our AAPCs are probably not able to efficiently stimulate. Indeed, until now, we have never been able with our AAPCs to mount specific T cell responses from TLs which have never encountered *in vivo* their antigen.

In the first patient, no specific lysis of FSP25- and FSP26-pulsed cells was observed. Anti-FSP25 and anti-FSP26 TLs potentially present in this patient are therefore probably also naïve TLs. This suggests that the mutation has most certainly never been present in this patient. Indeed, patient adenoma did not harbor the *CASP5(-1)* mutation according to our multiplex PCR, and if we had been able to activate FSP25- and FSP26-specific CTLs with our AAPCs from the peripheral blood of this patient, this would have suggested that an immune response against tumor cells carrying the mutation had already taken place during tumor development, leading to their elimination. Indeed, in a relative of a Lynch syndrome patient, who carried a constitutional MMR gene mutation but did not develop a cancer, we have already been able to activate TLs against FSP02 neopeptide derived from a *TGFβR2*(-1) frameshift mutation (data not shown) which was probably present in tumor cells that were eliminated before cancer development.

In the second patient, specific cytotoxic responses against FSP25 were observed. However, we were not able to stimulate specific cytotoxic responses against FSP26. Although present, the responses obtained with our positive control, M1m, and with FSP25 (only with $AAPC^{A2.1/FSP25}$) were relatively low. This may be due to the different chemotherapies this patient had received, which could have weakened her immune system (Table 1) when blood

was taken for our study. It should be also noted that in this patient there were few tumor cells (13%) carrying the mutation, which could also explain a weak *CASP5*(-1) frameshift mutation immunogenicity.

In the third patient, the response obtained with our positive control, M1m, was robust. A specific lysis against FSP25-pulsed cells was obtained for TLs cocultured with $AAPC^{A2.1/FSP25}$, but also for TLs cocultured with $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$, showing that our $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$ degraded the antigen and presented the FSP25 peptide. Moderate lysis of FSP26-pulsed cells was observed for TLs cocultured with $AAPC^{A2.1/FSP26}$ and $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$, showing that $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$ also presented the FSP26 peptide. It should be noted that in this patient, almost all tumor cells (98%) were carrying the mutation. IFN-gamma secretion study confirmed the results of the cytotoxic tests for FSP25. The stronger responses against FSP25 and FSP26 in terms of IFN-gamma specific secretion with $AAPC^{A2.1/CASP5(-1)}$ than with AAPC directly encoding the peptides could be explained by a better presentation of these peptides after degradation of the full length antigen, as already seen with other antigens[22]. However, this phenomenon has not been observed in cytotoxic tests and will have to be studied more precisely.

Using our AAPCs, we demonstrate that in MSI CRC patients with *CASP5*(-1) mutation, who have a less good prognosis, cytotoxic T cell responses targeting the mutated protein could be mounted *in vitro*, demonstrating by the way that *CASP5*(-1) mutated mRNA NMD is indeed absent or incomplete. FSP25 was more immunogenic than FSP26, at least *in vitro*. Importantly, FSP25- and FSP26-specific TLs efficiently lysed HLA-$A2.1^{+}$ MSI CRC HCT116 cell line harboring the *CASP5*(-1) mutation, further demonstrating absence or incomplete NMD of *CASP5*(-1) mutated mRNA, and also demonstrating presentation of peptides FSP25 and FSP26 by tumor cells and incomplete resistance to apoptosis of *CASP5*(-1) mutated tumor cells *in vitro*. Therefore, CASP5(-1) neoantigen represents a target of great therapeutic interest for adoptive cell or vaccine therapy strategies, especially FSP25 in the HLA-A2.1 context, and our AAPCs constitute a unique tool for developing new adoptive cell and vaccine therapy strategies in microsatellite unstable colorectal cancers. Combined cellular approaches based on specific TL activation against CASP5 mutated protein with a pro-apoptotic or an anti-apoptotic inhibitor molecule could even be envisaged for the treatment of *CASP5*(-1) mutated MSI CRC patients.

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).

Patients				Tumor		Treatment	
n°	Year of birth	Sex	Age at diagnosis	Localize	TNM Stage	Surgery	Others
Patient n°1 (P1)	1970	M	41 years	Colon	Adenoma	Yes	No
Patient n°2 (P2)	1967	F	34 years	Rectum	pT2N0	Yes	Chemotherapy
Patient n°3 (P3)	1958	F	42 years	Colon	pT3N2Mx	Yes	Chemotherapy

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

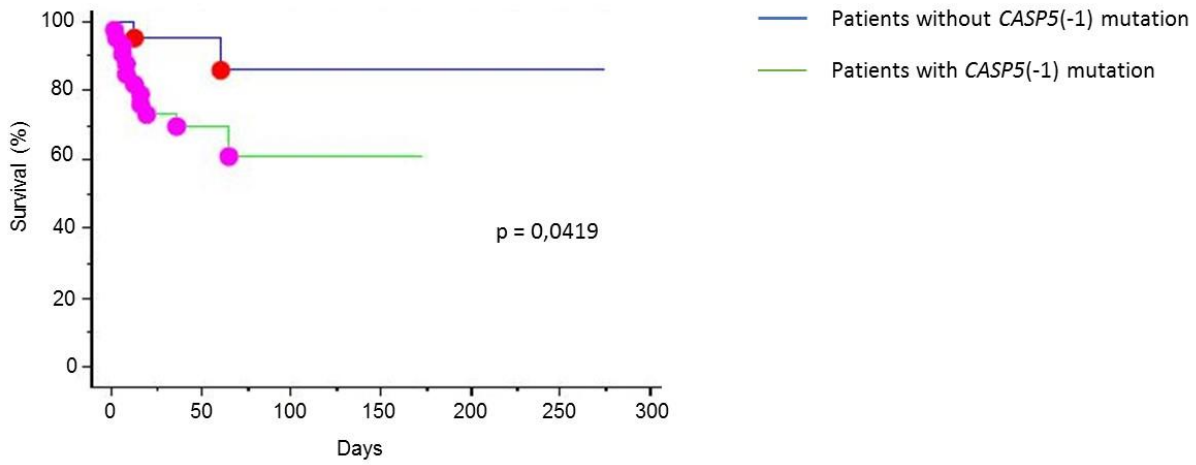
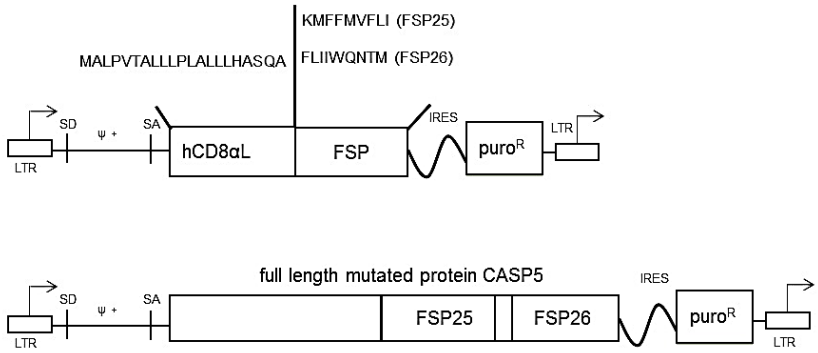
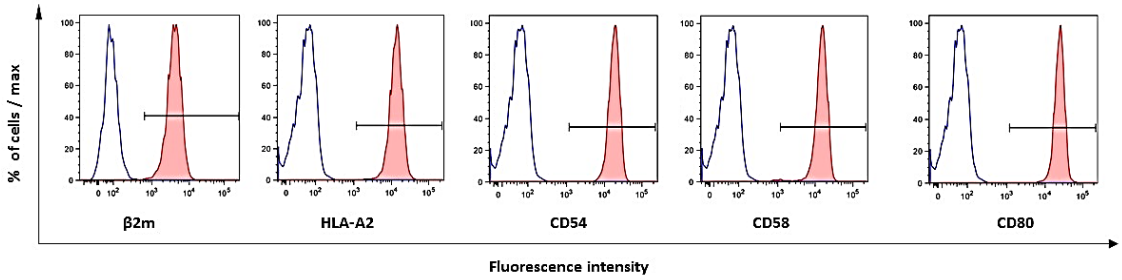


Figure 1

A


KMFFMVFLI (FSP25)
MALPVTALLLPLALLLHASQA
FLIIWQNTM (FSP26)
SD
SA
IRES
LTR
hCD8αL
FSP
puroR
LTR
full length mutated protein CASP5
IRES
SD
SA
FSP25
FSP26
puroR
LTR
LTR

B


% of cells / max
β2m
HLA-A2
CD54
CD58
CD80
Fluorescence intensity

C

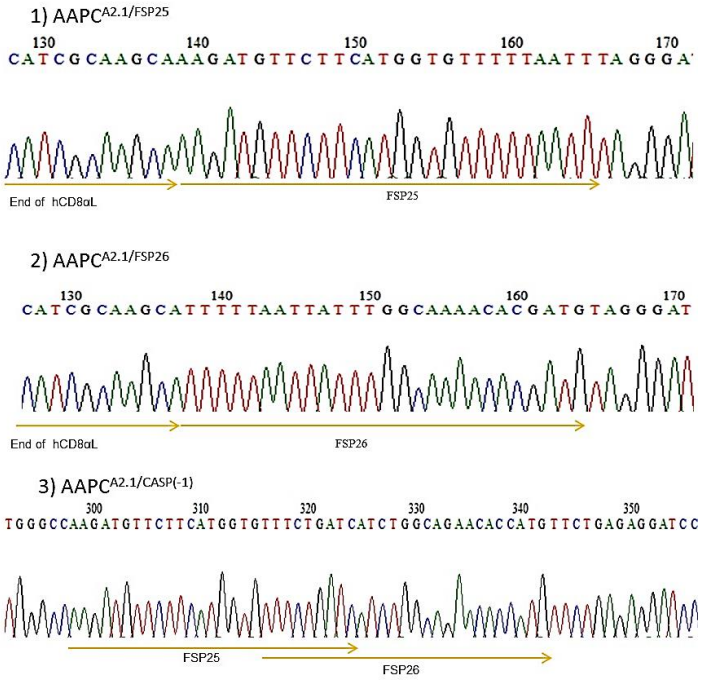

1) AAPCA2.1/FSP25
130 140 150 160 170
CATCGCAAGCAAAGATGTTCTTCATGGTGTTTTTAATTTAGGGA
End of hCD8αL
FSP25
2) AAPCA2.1/FSP26
130 140 150 160 170
CATCGCAAGCATTTTTAATTATTTGGCAAAACACGATGTAGGGAT
End of hCD8αL
FSP26
3) AAPCA2.1/CASP(-1)
300 310 320 330 340 350
TGGGCCAAGATGTTCTTCATGGTGTTTCTGATCATCTGGCAGAACACCATGTTCTGAGAGGATCC
FSP25
FSP26

Figure 2

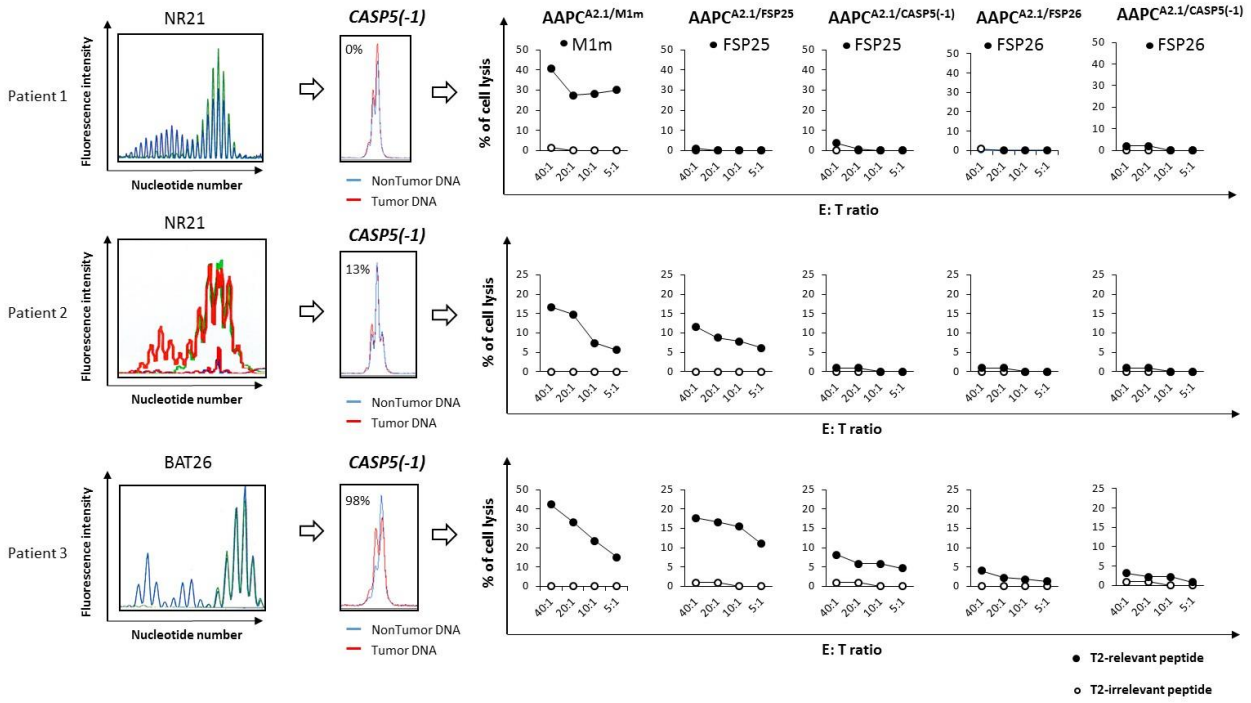


Figure 3

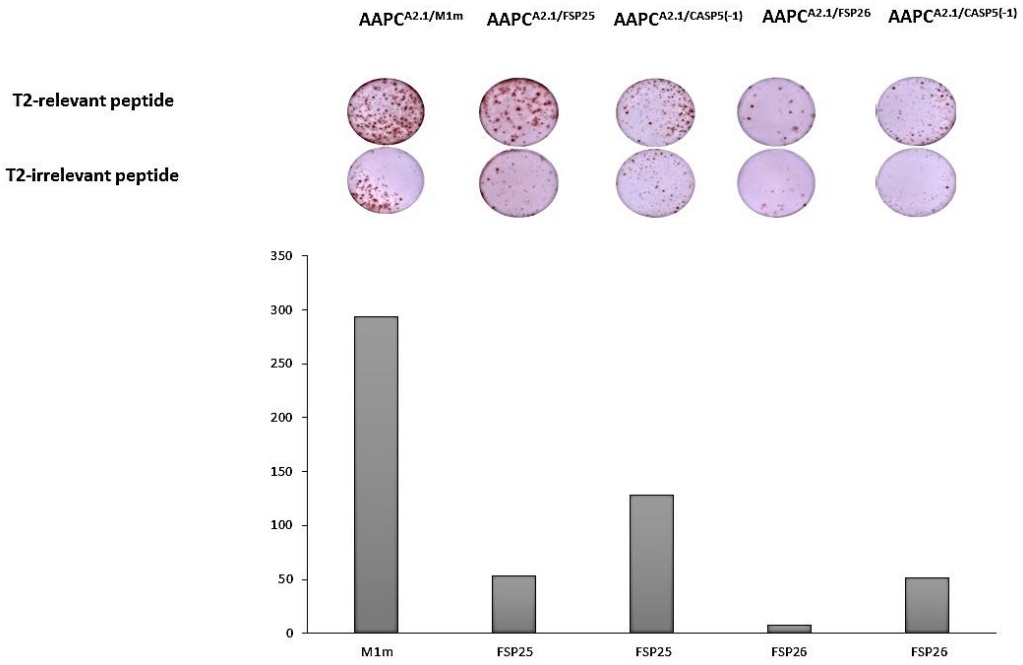


Figure 4

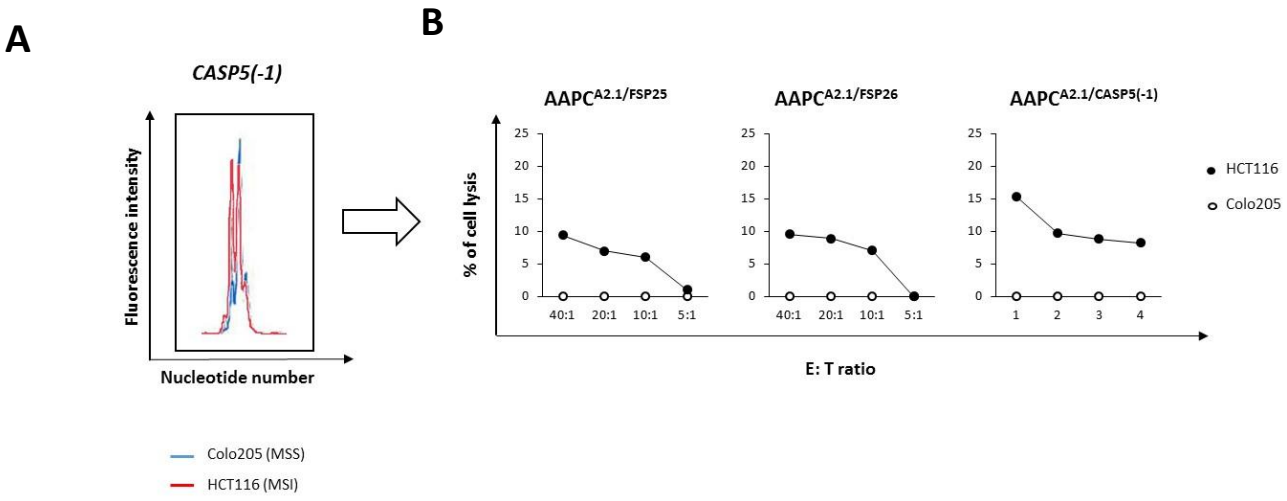

A
CASP5(-1)
Fluorescence intensity
Nucleotide number
Colo205 (MSS)
HCT116 (MSI)
B
AAPC A2.1/FSP25
AAPC A2.1/FSP26
AAPC A2.1/CASP5(-1)
% of cell lysis
25
20
15
10
5
0
40:1
20:1
10:1
5:1
1
2
3
4
E: T ratio
HCT116
Colo205

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 CD8α leader, hCD8αL), 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, β2m, 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-β2m-PE antibodies were used for labelling AAPCs. The positivity threshold was set according to the control IgG (blue peak). β2m: β2 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 ^{51}Cr 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 ^{51}Cr release assays on HLA-$A2.1^+$, colorectal cancer cell lines HCT116 and Colo205, at different effector to target (E:T) ratios.

- Discussion -

Les cancers colorectaux (CCR) à instabilité microsatellitaire (IMS) sont caractérisés par une densité plus importante de lymphocytes infiltrant la tumeur, et une très grande proportion de ces lymphocytes sont des LTC[390,400]. Ce fort infiltrat lymphocytaire pourrait être expliqué par le statut particulier de ces tumeurs, dans lesquels des néoantigènes spécifiques des cellules cancéreuses sont observés. Ces néoantigènes sont susceptibles d'être dégradés et présentés sous forme de néopeptides par les cellules tumorales et les cellules présentatrices d'antigène, et ces néopeptides ainsi présentés peuvent être la cible d'une forte réponse immunitaire cellulaire adaptative anti-tumorale. En 2008, l'équipe de Magnus Von Knebel Doeberitz a démontré que des lymphocytes infiltrant les tumeurs extraits de tumeurs de patients atteints de CCR à IMS étaient capables de reconnaître spécifiquement les néopeptides HLA-restreints associés à ces tumeurs et de lyser spécifiquement *in vitro* des lignées cellulaires dérivées de CCR à IMS. Toujours en 2008, Le Gouvello et collaborateurs ont montré une corrélation entre le fort infiltrat lymphocytaire et la surexpression de marqueurs d'activation des LTC dans les CCR à IMS, ce qui suggère que les néoantigènes peuvent susciter une réponse des LT plus puissante que celle trouvée dans les CCR à microsatellites stables (MSS). Au vu de toutes ces données, il était apparu crucial à l'équipe d'analyser la corrélation entre la présence de mutations décalant le cadre de lecture et l'infiltrat lymphocytaire dans les CCR à IMS. Pour cela, chez 61 patients atteints de CCR à IMS, la fréquence des mutations décalant le cadre de lecture affectant 19 gènes contenant des régions répétées codantes cibles d'une IMS a été étudiée par PCR multiplexes fluorescentes, puis les lymphocytes infiltrant les tumeurs de ces patients ont été étudiés grâce à un immunomarquage CD3[386]. Nous avons montré chez ces patients que le nombre et le spectre des mutations décalant le cadre de lecture étudiées étaient corrélés avec la densité de LT totaux infiltrant les tumeurs ($CD3^+$). Dans les CCR à IMS, le nombre global de mutations décalant le cadre de lecture est associé à la progression tumorale et à la densité de lymphocytes infiltrant les tumeurs, ce qui révèle la pertinence clinique de stratégies d'immunothérapie cellulaire dans ce type de tumeur. Suite à cette étude, avec une cohorte plus grande, de 103 patients atteints de CCR à IMS, provenant de deux séries indépendantes, pour déterminer si les mutations décalant le cadre de lecture étaient corrélées avec la densité de différentes sous-populations de lymphocytes infiltrant les tumeurs, nous avons étudié les marqueurs CD3 (LT totaux), CD8 (LTC) et FOXP3 (LTreg) en utilisant des TMA (*Tissue Micro-Arrays*)[413]. Nous avons trouvé

que la densité de LT infiltrant $CD8^+$ était corrélée avec le nombre et le spectre des mutations décalant le cadre de lecture. En outre, nous avons prouvé chez des patients HLA-$A2^+$ que des réponses T $CD8^+$ anti-tumorales spécifiques pouvaient être montées *in vitro* contre des mutations décalant le cadre de lecture présentes dans leur tumeur, ouvrant ainsi la voie au développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie personnalisée.

Forts de ces différents résultats très encourageants obtenus précédemment, nous avons donc entrepris d'étudier plus finement la réponse immunitaire spécifique de néopeptides exprimés dans la tumeur de patients atteints de CCR à IMS, dans le contexte de la molécule HLA-A2.1, la plus fréquente dans la population caucasienne. Toutefois, cela nécessite de connaître les néopeptides d'intérêt thérapeutique, associés aux CCR à IMS et reconnus spécifiquement par des LTC. Le but de cette thèse était de caractériser des néopeptides HLA-A2.1-restreints immunogènes dans le cadre des CCR à IMS. Pour cela, deux approches d'identification ont été utilisées. La première est une approche directe d'identification des néopeptides, basée sur une immunoprécipitation des complexes HLA-peptide exprimés par nos CPAA et une détermination de la masse et de la séquence des néopeptides présentés, par spectrométrie de masse. La deuxième approche d'identification des néopeptides est basée sur l'utilisation d'algorithmes de prédiction bioinformatique. Ces deux approches n'apportent aucune information quant au caractère immunogène des peptides identifiés. L'étude de l'immunogénicité des néopeptides identifiés est effectuée par coculture de LT de patients avec des CPAA codant ces néopeptides.

Partie I : caractérisation par spectrométrie de masse de néopeptides d'intérêt thérapeutique

Dans cette étude, nous voulions non seulement proposer une approche directe d'identification des néopeptides, alternative ou complémentaire des approches actuelles basées sur l'utilisation de logiciels de prédiction bioinformatique. En effet, tous les néopeptides prédits n'existent pas forcément, ne sont pas forcément présentés de façon physiologique. De nombreuses études d'identification de néopeptides, notamment dans les mélanomes, sont basées sur l'utilisation du séquençage à haut débit. Toutefois, les mutations *de novo* détectées doivent être évaluées par des tests fonctionnels pour s'assurer de la production de néoantigènes et de la dégradation de ceux-ci en néopeptides immunogènes.

Dans notre approche d'identification par spectrométrie de masse, nous avons utilisé des cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) capables d'exprimer et de dégrader des néoantigènes, et de présenter des néopeptides d'intérêt issus de la dégradation de ces néoantigènes au sein de la molécule HLA-A2.1[412,413]. Les néoantigènes exprimés par nos CPAA ont été sélectionnés suite à l'identification de mutations du cadre de lecture par PCR multiplexes chez des patients HLA-$A2^+$ atteints de CCR à IMS. Les gènes contenant une ou plusieurs répétition(s) mononucléotidique(s), que nous avons analysés pour déterminer les mutations décalant le cadre de lecture, ont été sélectionnés selon plusieurs critères : la fréquence des mutations dans les séquences répétées codantes supérieure à 20%, une implication possible du gène muté dans la carcinogenèse ou encore une réponse immunitaire spécifique contre la protéine mutée, documentée. Dans cette étude, nous avons travaillé avec un néoantigène issu de la délétion d'une adénine dans une séquence répétée codante de 10 adénines présente dans le gène codant le récepteur au TGFβ de type 2. La fréquence de cette mutation dans les CCR à IMS est d'environ 80%[386]. Pour la mise au point de notre approche, nous avons utilisé l'autoantigène MART-1 surexprimé dans les mélanomes, connu pour être fortement immunogène et présenté efficacement par nos CPAA.

Nous avons tout d'abord vérifié pour ce travail que les CPAA utilisées exprimaient bien de manière stable les molécules β2m, HLA-A2.1, CD54, CD58 et CD80, et qu'elles étaient bien résistantes à la puromycine, confirmant la présence de l'antigène d'intérêt dans les CPAA.

Jusqu'à présent, dans tous les travaux de l'équipe, les cocultures de nos CPAA avec des LT, ont toujours été réalisées en utilisant des CPAA irradiées. En effet, dans nos expériences, les CPAA sont irradiées afin d'arrêter leur division. Dans l'optique d'un développement clinique, l'utilisation de CPAA irradiées nous permet de nous assurer par la suite de leur absence au sein des cultures de LT. Par contre, pour les expériences de spectrométrie de masse, vu les grandes quantités de cellules utilisées au départ, d'un point de vue technique, il n'était pas envisageable de les irradier avant. Il nous fallait donc nous assurer que, comme dans les cocultures réalisées avec des CPAA irradiées[412,413], les CPAA non irradiées, exprimant un antigène donné, permettaient l'obtention de LT spécifiques de cet antigène. De façon intéressante, nous avons pu observer que des CPAA non irradiées (exprimant les peptides M1m, M1 ou la protéine entière MART-1) permettaient bien d'obtenir des LT spécifiques des peptides qu'elles exprimaient. De plus, les LT obtenus étaient bien fonctionnels (données non présentées). Nous avons ainsi la confirmation que nos CPAA,

irradiées ou non irradiées, sont capables de présenter des peptides tumoraux directement codés, mais aussi de dégrader des antigènes entiers transduits en peptides tumoraux présentés efficacement au sein des molécules HLA-A2.1 qu'elles expriment.

Forts de ces résultats, des expériences d'immunoprécipitation des molécules HLA-A2.1 exprimées par nos CPAA ont ensuite été réalisées. Sur les spectres des immunoprécipitats de chaque CPAA, en prenant en compte les différentes masses mono-isotopiques obtenues, un profil général correspondant à des peptides a été observé. Ces peptides avaient une taille comprise entre 8 et 13 acides aminés. Les peptides de 9 et 10 acides aminés étaient les plus nombreux. La poche HLA-A2.1 est connue pour lier particulièrement des nonamères et des décamères. De plus, les nonamères et décamères observés, avaient majoritairement des acides aminés leucine (L), valine (V) et alanine (A) en position P2 et C-terminale. L'affinité de ces nonamères et décamères pour la poche HLA-A2.1 a été étudiée avec différents algorithmes, et la majorité de ces peptides étaient prédits pour se lier fortement à la poche A2.1. Ces données montrent que nos immunoprécipitations sont bien spécifiques des poches HLA-A2.1. Nous confirmons également ici, comme l'a déjà montré Rammensee et collaborateurs[332] et par la suite Hunt et collaborateurs[353] que les acides aminés L, V et A représentent de forts motifs d'ancrage à la poche HLA-A2.1.

Un résultat majeur de notre étude est la détection et la caractérisation de la séquence en acides aminés des peptides M1m et FSP02, respectivement à partir de $CPAA^{A2.1/M1m}$ et de $CPAA^{A2.1/FSP02}$. Ce résultat nous a permis d'établir la preuve de faisabilité de notre approche directe d'élution de peptides à partir de CPAA. Avec notre approche, nous sommes capables de détecter des peptides en partant de CPAA les codant directement. Ceux-ci sont bien présentés dans les poches des molécules HLA-A2.1, en quantité supérieure au seuil de détection de la technologie utilisée. De façon surprenante, le peptide AAAGIGILTV a été identifié à partir des $CPAA^{A2.1/M1}$ au lieu du peptide AAGIGILTV (M1) attendu. Dans nos constructions peptidiques, une séquence dérivée du *human CD8 alpha leader* (*hCD8αL*, MALPVTALLLPLALLLHASQA) a été ajoutée en amont de la séquence du peptide d'intérêt afin de permettre son adressage dans le réticulum endoplasmique. Des logiciels de prédiction tels que SignalP et PSORT sont utilisés pour prédire le clivage entre *hCD8αL* et le peptide transduit. Pour toutes les constructions peptidiques, un clivage avec un fort niveau de confiance avait été prédit entre *hCD8αL* et les peptides transduits (M1m, M1 ou FSP02). Dans la construction $CPAA^{A2.1/M1}$, un bon clivage avait donc été prédit entre le dernier acide aminé alanine (A) de *hCD8αL* et le premier acide aminé (A) du peptide M1. Malgré les résultats de

cette prédiction, le peptide AAAGIGILTV obtenu par spectrométrie nous montre que le clivage ne s'est pas produit comme prévu. Le dernier acide aminé de *hCD8αL* a donc été rajouté au peptide M1, générant un autre peptide présenté par les CPAA. Nous avons donc développé un outil permettant de caractériser finement le site de clivage d'un peptide et de compléter les données des logiciels de prédiction de clivage peptidique. Avec cette approche, nous pourrons caractériser avec certitude les peptides présentés dans les poches A2.1. Ceci pourrait permettre de savoir de façon précise contre quel peptide les LT ont été activés. Nous pouvons utiliser des outils tels que les multimères HLA (tétramères, pentamères ou dextramères) pour caractériser des LT spécifiques d'un épitope donné. Ce sont des complexes HLA-peptide généralement couplés à un fluorochrome, se liant à des TCR de LT spécifiques. Nous avons pu observer que des dextramères spécifiques du peptide M1 étaient capables de reconnaître des LT spécifiques de M1m ou des LT activés avec les CPAA codant le peptide AAAGIGILTV, et *vice versa* pour les dextramères spécifiques du peptide M1m. Ces outils multimériques HLA-peptide sont certes efficaces, mais pas à l'acide aminé près. L'élution de peptides à partir de CPAA codant des peptides pourrait nous permettre d'améliorer les logiciels de prédiction de clivage, et de changer les acides aminés en C-terminal de la séquence *leader* pour affiner le clivage du peptide d'intérêt, afin de libérer le bon peptide et d'éviter d'affecter la nature de la réponse suite à un mauvais clivage. En effet, une absence de réponse après stimulation avec les $CPAA^{A2.1/M1}$ aurait pu nous faire conclure à un caractère non immunogène du peptide M1, ignorant qu'en réalité, un autre peptide était présenté. Dans notre cas, nous avons pu activer tout de même des LT spécifiques du peptide AAGIGILTV. De plus, ces LT étaient fonctionnels (données non montrées). Nous savons, d'après les travaux de Derré et collaborateurs, que des PBMC, des clones ou des TIL dérivés de patients HLA-$A2.1^+$ activés contre le peptide AAGIGILTV sont en mesure de reconnaître spécifiquement le peptide $AAAGIGILTV^{425}$. Ceci pourrait, à l'inverse, expliquer la réponse obtenue avec des CPAA présentant le peptide AAAGIGILTV, les deux peptides pouvant, peut-être, être reconnus par les mêmes LT. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que dans les $CPAA^{A2.1/M1}$, il y ait effectivement une présentation du peptide AAGIGILTV bien clivé, mais en quantité beaucoup moins importante et donc en dessous du seuil de détection minimale par spectrométrie de masse.

Des prédictions bioinformatiques de l'affinité de liaison à la poche HLA-A2.1 effectuées avec le logiciel SYFPETHI, ont montré que le peptide AAAGIGILTV est beaucoup plus affin pour la poche HLA-A2.1 que le peptide natif AAGIGILTV. Des CPAA

pourraient être générées, à partir de nonamères ou de décamères tumoraux naturels connus, puis les acides aminés en P1, P2 ou C-terminal pourraient être modifiés afin d'étudier l'affinité et l'immunogénicité des différents peptides. L'élution de peptides à partir de ces CPAA permettrait de vérifier la séquence en acide aminés exacte du ou des peptide(s) principalement présenté(s), et les tests fonctionnels permettraient de valider l'immunogénicité des peptides étudiés. L'acide aminé en P1 est important car il peut affecter la reconnaissance de certains peptides par les LT A2.1-restreints, comme il a été montré pour l'acide aminé acide glutamique dans les peptides EAAGIGILTV et ELAGIGILTV[425]. Une autre étude menée par Schneider et collaborateurs a également montré, en utilisant des clones HLA-B*4501-restreints spécifiques du peptide AEEAAGIGILT de la protéine MART-1, que la présence de la thréonine à l'extrémité C-terminale pourrait abroger la reconnaissance par un clone T CD8+, tandis qu'un autre clone T CD8+ reconnaissait le peptide indépendamment de la présence ou de l'absence de cette thréonine[450]. Couplée à des tests basés sur l'utilisation d'outils multimériques HLA-peptide spécifiques ou avec des tests de cytotoxicité, la caractérisation par spectrométrie de masse de peptides élués à partir de CPAA codant des peptides d'intérêt pourrait donc nous permettre de modifier les acides aminés importants pour l'affinité des peptides pour les poches du CMH, mais également les acides aminés importants pour la reconnaissance par le TCR, et ainsi de caractériser les peptides, naturels ou modifiés, de plus grand intérêt clinique.

Malgré le fait qu'un profil peptidique général ait été obtenu après immunoprécipitation en partant des CPAA exprimant les protéines entières MART-1 et TGFβR2(-1), les peptides M1 et FSP02 n'ont pas été retrouvés. Pourtant, les tests fonctionnels ont prouvé que ces CPAA, codant ces protéines entières, étaient capables de stimuler efficacement des LT spécifiques des peptides M1 et FSP02. Ces peptides sont donc bel et bien présentés. L'absence de détection par spectrométrie de masse est sans doute due à une quantité insuffisante de peptide élué. Malgré les pertes générées lors des différentes étapes du protocole d'élution, vues les quantités de protéines de départ, nous aurions pu espérer détecter au moins les ions correspondant aux peptides recherchés. Cela n'a pas été le cas, ce qui suggère que ces peptides devaient être très faiblement présentés dès le départ, mais toute de même en quantité suffisante pour activer efficacement des LT fonctionnels. Ceci confirme ce qu'évoquent Lanzavecchia et collaborateurs depuis 20 ans sur la quantité de complexes CMH-peptide nécessaires pour activer un LT[426]. D'après leurs travaux réalisés dès 1995, les LT peuvent être activés par, puis reconnaître, un très petit nombre de complexes CMH-

peptide présentés à la surface des CPA[426]. C'est en se basant sur le fait que l'interaction entre un TCR et son ligand est de faible affinité que Lanzavecchia et collaborateurs ont suggéré qu'un très petit nombre de TCR pouvait être engagé dans l'interaction avec les CPA. Cela a donc soulevé indirectement la question de savoir combien de complexes CMH-peptide étaient nécessaires pour l'activation efficace d'un LT. Ils ont montré que des CPA pulsées avec de faibles concentrations de peptide (50nM), présentaient environ 100 complexes CMH-peptide. Ces 100 complexes CMH-peptide pouvaient interagir avec environ 18 000 TCR, ce qui suggérait qu'un seul complexe CMH-peptide pourrait être suffisant pour activer 180 TCR[426]. Dans les expériences de quantification effectuées par cette équipe, la concentration de peptide la plus faible testée était de 50nM. Nous ne pouvons exclure que des concentrations encore plus faibles permettraient d'activer des LT. La concentration de 50nM correspondant à environ 100 complexes CMH-peptide, nous pouvons envisager que moins de 100 complexes CMH-peptide pourraient être suffisants pour activer un LT. Ces travaux emblématiques nous montrent que les peptides immunogènes capables de déclencher une forte réponse immunitaire spécifique ne sont pas forcément les plus abondants dans les poches.

En outre, suite à plusieurs études de quantification des complexes CMH-peptide réalisées par d'autres équipes, nous savons également qu'une cellule normale présente environ 10^4 peptides différents sur 10^5 à 10^6 molécules du CMH-I données. Le nombre de molécules par cellule d'un seul peptide donné de classe I pourrait donc se situer entre 1 et 10 000[124]. De plus, les épitopes de LT dérivés d'agents pathogènes pourraient être présentés à une concentration plus faible que ceux dérivés d'autoantigènes abondamment apprêtés et présentés[451]. Mais, comme discuté précédemment, un très faible nombre de molécules est toute de même suffisant pour une activation efficace des LT[426,452,453]. Dans les approches d'identification de peptides HLA-restreints par spectrométrie de masse, cette très faible concentration de peptides pourtant bien immunogènes (peut-être même pas plus de 1 à 1000 molécules par cellule[451]) justifie la très grande quantité de cellules habituellement utilisée (entre 5.10^9 et 5.10^{10}). En se basant sur le fait qu'une perte importante de peptides se produit au cours du processus d'extraction de ces peptides (50 à 80% sans doute au maximum), l'identification réussie des épitopes T d'intérêt nécessitera probablement des techniques de séquençage avancées et hautement sensibles, permettant de séquencer des peptides présents à des concentrations de l'ordre du femtomole, provenant de mélanges hautement complexes. L'absence de détection des peptides d'intérêt (M1 ou FSP02) dans les immunoprécipitats des $CPAA^{A2.1/MART-1}$, $CPAA^{A2.1/TGF\beta R2\ (V1)}$ et $CPAA^{A2.1/TGF\beta R2\ (V2)}$ est donc sans doute due à un très

faible nombre de complexes HLA-peptide au départ, que la technologie utilisée n'est pas assez sensible pour détecter.

Dans nos conditions d'analyse, nous avons pu évaluer très approximativement le nombre de complexes CMH-peptide d'intérêt présents à la surface de nos CPAA codant ces peptides, en utilisant une méthode de calcul développée par l'équipe de Rammensee[344]. Le calcul du nombre de copies par cellule pour un peptide endogène donné est basé sur la comparaison de l'intensité du signal mesuré pour ce peptide dans les immunoprécipitats avec celle enregistrée pour une quantité connue du peptide synthétique correspondant. En étant très prudents dans nos calculs, nous avons pu estimer qu'il y avait moins de 130 complexes HLA-A2.1-M1m détectables par $CPAA^{A2.1/M1m}$, correspondant à environ 10nM de peptide M1m. Par contre, pour les $CPAA^{A2.1/FSP02}$, nous avons pu estimer qu'il n'y avait pas plus de 10 complexes HLA-A2.1-FSP02 détectables par CPAA, correspondant à 0.01nM de peptide FSP02. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le peptide M1m est beaucoup plus affin pour la poche HLA-A2.1 que le peptide FSP02, et qu'il est donc plus stable dans la poche, moins en compétition avec d'autres peptides dérivés d'antigènes probablement endogènes de plus forte affinité pour les poches HLA-A2.1. Malgré le fait que, dans ces constructions, le peptide d'intérêt soit envoyé directement dans le réticulum endoplasmique grâce à une séquence signal (*hCD8αL*), ce peptide est quand même présent en quantité très limitée. En partant de CPAA codant une protéine entière cytoplasmique, apprêtée normalement comme une protéine endogène, des quantités encore plus faibles de peptide d'intérêt pourraient donc être attendues. La protéine entière subit en effet toutes les étapes du « processing » dans la cellule (dégradation en peptides par le protéasome, transport de peptides par la machinerie TAP et liaison de peptides aux molécules HLA dans le complexe de chargement des peptides), limitant la quantité de peptide d'intérêt potentiellement présentée. Sachant que des CPAA exprimant les protéines entières MART-1 et TGFβR2(-1) permettent d'activer efficacement des LTC fonctionnels spécifiques de peptides dérivés de ces protéines entières mais non détectés, l'idée qu'une très faible quantité de complexes HLA-peptide puisse être suffisante pour activer efficacement un LT est largement renforcée.

Pour aller plus loin et vérifier que l'absence des peptides d'intérêt (M1 et FSP02) dans les immunoprécipitats des $CPAA^{A2.1/MART-1}$, $CPAA^{A2.1/TGF\beta R2\ (V1)}$ et $CPAA^{A2.1/TGF\beta R2\ (V2)}$ n'est pas due à une différence d'apprêtement des peptides antigéniques entre cellules murines et humaines, des immunoprécipitats de lignées cellulaires tumorales humaines HLA-$A2.1^+$ dérivées de CCR (Colo205 et HCT116) ont été analysés. La lignée Colo205, dérivée d'un

CCR à MSS, nous a servi de contrôle négatif. Nous savons que la lignée HCT116, dérivée d'un CCR à IMS, présente efficacement les néopeptides FSP02, FSP25, FSP26 et FSP30 sur les molécules HLA-A2.1, car elles ont pu être lysées spécifiquement par des LT activés par des CPAA exprimant ces FSP respectifs. Néanmoins, après analyse poussée des spectres obtenus, ces différents FSP n'ont pas été retrouvés dans les immunoprécipitats des cellules HCT116. En 2013, Kamata et collaborateurs avaient déjà élué des peptides A2.1-restreints à partir de la lignée HCT116 et n'avaient retrouvé aucun des FSP cités précedement[427]. Dans les années 2000, Schirle et collaborateurs ont immunoprécipité des cellules d'une lignée tumorale humaine dérivée d'un carcinome du colon, SW1116, HLA-A2.1^{+}, exprimant l'antigène ACE, et ils n'ont pas pu détecter le peptide dérivé de cet antigène décrit par certains comme immunodominant, CAP1 (YLSGADLNL), à partir de ces cellules[344]. Plus récemment, en 2016, Gloger et collaborateurs ont réalisé des immunoprécipitations de l'ensemble des molécules HLA-I sur 5 lignées cellulaires tumorales dérivées de mélanomes (FM-82, FM-93/2, Mel-624, MeWo et SK-Mel-5) exprimant la protéine MART-1. Après analyse par spectrométrie de masse, le peptide AAGIGILTV (M1) n'a été retrouvé dans aucune des lignées HLA-A2.1^{+}[428]. En accord avec ces différents travaux, nos données confirment que des peptides immunogènes connus pourraient ne pas être retrouvés à partir de lignées cellulaires tumorales humaines les exprimant. En partant d'une approche d'identification par spectrométrie de masse de peptides à partir de cellules tumorales primaires, il est donc possible de ne pas réussir à identifier les épitopes les plus immunogènes présentés dans la tumeur.

Pour expliquer la faible quantité de certains complexes CMH-peptide entraînant la non détection de peptides réellement immunogènes avec notre approche, nous pouvons également évoquer le mécanisme nouvellement décrit d'« épissage peptidique ». L'étape clé de transformation d'une protéine en épitopes HLA-I-restreints se fait dans le protéasome qui utilise différentes protéases pour dégrader les protéines en peptides. Le protéasome peut également couper et coller des séquences peptidiques d'une protéine ou de différentes protéines, libérant ainsi des antigènes peptidiques qui ne correspondent pas à la séquence de la protéine originale : c'est l'épissage peptidique. L'épissage de peptides par le protéasome peut conduire à la génération de peptides issus d'acides aminés non contigus mais dérivés d'une même protéine initiale ou de protéines différentes. Les peptides produits par épissage peuvent être présentés sur des molécules HLA-I et reconnus par des LTC spécifiques. Le processus d'épissage peptidique a été décrit pour la première fois à notre connaissance chez l'homme en

2004 par Hanada et collaborateurs, qui ont identifié un peptide antigénique dérivant de *FGF*-5 (*Fibroblast growth Factor-5*), un gène surexprimé dans certains cancers et reconnu par des LTC obtenus chez un patient atteint d'un carcinome rénal[430]. Ce peptide était composé de deux fragments de quatre et cinq acides aminés initialement non contigus dans la protéine parentale, séparés l'un de l'autre par un fragment de quarante acides aminés. A l'heure actuelle, les mécanismes de l'épissage peptidique par le protéasome ne sont pas encore très bien caractérisés. D'après les travaux de l'équipe de Nathalie Vigneron, quelques règles générales peuvent être évoquées. L'épissage peptidique a lieu dans le protéasome par une réaction de transpeptidation impliquant un intermédiaire acyl-enzyme se liant à l'un des fragments peptidiques de la protéine parentale et à une sous-unité catalytique du protéasome[429]. Pour mieux expliquer ce phénomène, nous pouvons nous appuyer sur l'exemple du peptide RSYVPLAHR dérivé de la protéine gp100, qui est présenté sur les molécules HLA-A3[431], décrit par l'équipe de Nathalie Vigneron comme le résultat d'un épissage peptidique par le protéasome[431]. Au cours de l'hydrolyse des liaisons peptidiques, le groupement hydroxyle de la thréonine N-terminale d'une sous-unité catalytique du protéasome produit une attaque nucléophile sur le carbonyle de la liaison peptidique. Ceci conduit à la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme dans lequel le fragment peptidique RSYVPLAH reste attaché au protéasome par une liaison ester. Normalement, cet intermédiaire acyl-enzyme est rapidement hydrolysé. Cependant, des fragments peptidiques, tels que RGS, présents dans le protéasome peuvent entrer en compétition avec des molécules d'eau, leur groupement amino N-terminal libre effectuant ainsi une attaque nucléophile sur l'intermédiaire acyl-enzyme. Cette transpeptidation conduit à la création d'une nouvelle liaison peptidique qui assemble les 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, RSYVPLAHR[429,431]. Cet épissage de peptide catalysé par le protéasome a été considéré jusque-là comme ne se produisant que rarement, en partie parce que la détection des peptides HLA-I-restreints subissant l'épissage par le protéasome a été entravée par des limites méthodologiques. En 2016, des expériences d'immunoprécipitation de complexes HLA et d'analyse par spectrométrie de masse des peptides élués réalisées sur les lignées cellulaires humaines GR-LCL et C1R et sur des fibroblastes humains ont montré que 30% des peptides HLA-restreints obtenus à partir de ces lignées subissaient un épissage peptidique dans le protéasome[432]. Ce phénomène pourrait donc être présent dans les CPAA et dans les lignées cellulaires tumorales humaines que nous

avons étudiées. Parmi les peptides détectés dans les immunoprécipitats de nos CPAA, 10% dérivent de gènes murins et 80% ont été qualifiés de séquences *de novo* car non reconnus par les bases de données peptidiques existantes (le travail d'identification des peptides détectés à partir des lignées cellulaires tumorales humaines reste à faire). Certains de ces peptides *de novo* pourraient être issus de ce phénomène d'épissage peptidique. Si ce phénomène se révèle être présent dans nos CPAA, cela suggère que des peptides ont pu être générés à partir de fragments différents des protéines entières transduites dans nos CPAA, et que, les séquences ne correspondant pas à des acides aminés contigus de la protéine originale, nous ne pouvons pas les détecter en alignant avec la séquence protéique connue. Si ce phénomène est présent, il pourrait même y avoir des peptides générés à partir de nos protéines entières humaines et de protéines murines, ce qui compliquerait encore plus la caractérisation de ces nouveaux épitopes antigéniques. L'analyse des 80% de peptides de séquences inconnues dans les différentes bases de données, qui ne s'alignent pas avec les séquences de nos protéines entières, devra être effectuée avec des outils bioinformatiques, non encore disponibles, prenant en compte le phénomène d'épissage peptidique, pour confirmer ou infirmer la présence de ce phénomène dans nos CPAA. Pour expliquer la faible quantité de certains peptides pourtant hautement immunogènes, échappant à la détection par spectrométrie de masse, et l'identification de peptides de séquences inconnues, l'existence de pseudogènes[454], la transcription aberrante de séquences introniques ou du brin complémentaire (transcription inversée)[455,456] et l'utilisation d'autres codons d'initiation et/ou de cadres de lecture alternatifs[457] peuvent également être évoquées.

Partie II : caractérisation de néopeptides d'intérêt thérapeutique à partir de prédictions bioinformatiques

Dans le but de mettre au point une approche d'immunothérapie spécifique personnalisée, le second volet de ce projet de thèse consistait, dans un premier temps, à caractériser les mutations *frameshift* présentes dans la tumeur d'un patient HLA-A2.1$^+$ donné atteint de CCR à IMS, dans un deuxième temps, à stimuler des LT du sang périphérique de ce patient, spécifiques de néopeptides issus de ces mutations, et, dans un troisième temps, à vérifier l'activité cytotoxique des LT stimulés. Nous avons testé cette approche à partir des tumeurs et du sang périphérique de trois patients HLA-A2$^+$ présentant un syndrome de Lynch.

Au laboratoire, nous avons mis au point trois PCR multiplexes, permettant de détecter les mutations *frameshift* dans 29 gènes contenant des séquences répétées codantes[413,414]. Dans un précédent travail de l'équipe auquel j'ai participé, grâce aux deux premières multiplexes, nous avons identifié différentes mutations *frameshift* présentes dans la tumeur d'un premier patient HLA-A2$^+$ présentant un syndrome de Lynch[413]. Par le biais des prédictions informatiques et de la littérature, nous avons sélectionné trois néopeptides (FSP02, FSP27 et FSP30) potentiellement issus de ces mutations et présentant une forte affinité pour la molécule HLA-A2.1. Nous avons ensuite stimulé les LT périphériques de ce patient avec des CPAA présentant les peptides correspondant aux néoantigènes exprimés dans sa tumeur. Les LT activés étaient capables de lyser spécifiquement des cellules cibles présentant les peptides d'intérêt, y compris des cellules tumorales exprimant les mêmes néoantigènes (Annexe 1). Ces résultats constituaient la preuve de concept qu'il devrait être possible, après avoir optimisé ce système, de proposer à des patients atteints de cancer à IMS, notamment aux patients jeunes présentant un syndrome de Lynch, et même à des apparentés porteurs d'une mutation constitutionnelle dans le cadre de ce syndrome, une stratégie d'immunothérapie cellulaire adoptive ou vaccinale personnalisée, curative ou même préventive, ciblant des néoantigènes exprimés par les cellules tumorales ou les plus fréquemment retrouvés.

Suite à ces travaux très encourageants, des mutations décalant le cadre de lecture ont été recherchées chez trois nouveaux patients HLA-A2.1$^+$. Chez le premier patient, l'analyse des multiplexes à révélé l'absence de mutation *frameshift*, malgré l'IMS détectée. Ce patient étant porteur d'un adénome, ce qui suggère que le défaut du système MMR se manifeste d'abord dans les microsatellites (non codants), probablement à cause de la longueur plus importante de ces séquences répétées. En effet, plus les séquences répétées sont longues, plus les erreurs de la polymérase sont fréquentes. L'IMS étant bien présente, cela suggère qu'avec le temps vont s'accumuler des mutations dans les séquences répétées codantes, plus courtes, et que certaines d'entre elles pourraient être à l'origine ou impliquées dans la transformation maligne des adénomes à IMS. Il faut préciser que les mutations sont étudiées sur de l'ADN issu d'un prélèvement tissulaire généralement unique, extrait au centre de la tumeur. Les tumeurs colorectales à IMS étant hétérogènes quant à leur profil mutationnel[458], pour la suite, il faudrait envisager d'extraire l'ADN sur lequel les mutations seront étudiées, à partir de plusieurs prélèvements tissulaires issus de régions tumorales différentes.

Chez les deux autres patients HLA-A2.1$^+$, atteints de CCR à IMS, l'analyse des séquences répétées codantes des 29 gènes a montré que plusieurs gènes étaient mutés au

niveau de leur tumeur, parmi lesquels se trouvait le gène *CASP5*. La mutation détectée était une délétion d'une adénine (A) contenue dans la séquence répétée codante de 10A présente dans le gène *CASP5*. Le gène de la *CASP5* est impliqué dans la réponse inflammatoire et l'apoptose, et sa mutation pourrait jouer un rôle important dans le développement et la progression de la tumeur. Nous nous sommes particulièrement intéressés à cette mutation (-1) du gène de la *CASP5* dans cette étude, tout d'abord du fait de sa fréquence, rapportée dans la littérature, dans les cancers à IMS. En effet, cette mutation a été retrouvée dans 60% des CCR à IMS[413,414] et a été détectée dans des carcinomes du colon, de l'estomac ou du poumon, et dans des leucémies aiguës[444]. Dans nos cohortes de patients atteints de CCR à IMS, nous avons pu confimer une fréquence élevée de cette mutation[413]. Et les tumeurs des deux patients HLA-A2.1^{+} de cette étude atteints d'un CCR à IMS ont été retrouvées mutées.

Un argument majeur qui nous a également encouragé à étudier plus spécifiquement cette mutation chez ces patients, était la survie moins bonne des patients de notre cohorte du CHU de Rouen touchés par cette mutation. Notre hypothèse est que la présence de cette mutation chez ces patients pourrait rendre dans une certaine mesure leurs cellules tumorales résistantes à l'apoptose. Chez le patient 3, la mutation était même présente dans 98% des cellules tumorales, suggérant son rôle dans le développement et la progression de la tumeur.

La perte d'une adénine (-1) dans une séquence codante de 10 adénines ($(A)_{10}$) du gène *CASP5* entraîne un décalage du cadre de lecture et la génération potentielle de deux néopeptides HLA-A2.1-restreints déjà décrits dans la littérature comme immunogènes[392]. Ces épitopes pourraient donc représenter des cibles d'une réponse immunitaire cytotoxique anti-tumorale chez des patients HLA-A2.1+ dont la tumeur présente la mutation. Toutefois, pour une stratégie thérapeutique, il faut prendre en considération le fait que les mutations *frameshift* identifiées pourraient conduire à l'apparition d'un codon stop prématuré à l'origine d'un mécanisme de NMD (*Nonsense Mediated mRNA Decay*). En effet, pour générer un néoantigène, la protéine mutée doit contenir une nouvelle séquence d'acides aminés dans sa partie COOH-terminale codée par la séquence d'ADN en aval de la mutation. La NMD est un mécanisme de « contrôle qualité » des ARNm dépendant de la traduction, conduisant à la dégradation des ARNm contenant un codon stop prématuré à plus de 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon[448]. Tous les ARNm remplissant ces critères ne subissent pas la NMD et même lorsqu'ils y sont sensibles, ce phénomène est souvent incomplet. La transcription du gène *CASP5* porteur de la mutation retrouvée ici engendre des ARNm contenant un codon stop prématuré avant le dernier exon, dont la dégradation est donc

prédite. Mais dans les CCR à IMS, une étude[449] a démontré qu'il pouvait y avoir une résistance des cellules tumorales au système NMD et que ce dernier pouvait même être inhibé. Précisons qu'une inhibition de la NMD peut être due à la cellule tumorale elle-même mais également au microenvironnement tumoral, dans des situations de stress cellulaire liées à une hypoxie ou à une privation en acides aminés[459]. De plus, l'élimination complète d'un ARNm par NMD n'empêcherait pas nécessairement la présentation de néopeptides par les cellules tumorales mutées, étant donné que la phase pionnière de la traduction des ARNm, qui a lieu avant la NMD, représente une source majeure de peptides antigéniques susceptibles d'être présentés dans le contexte HLA[460]. D'ailleurs, des LT de patients atteints de CCR à IMS, spécifiques des néopeptides issus de cette mutation de *CASP5*, ont déjà pu être activés *in vitro*[392].

Le logiciel le plus couramment utilisé pour la prédiction des néopeptides HLA-A2.1-restreints est SYFPETHI[138]. Les prédictions de celui-ci sont basées sur l'attribution de scores spécifiques à chacun des acides aminés du peptide en fonction des caractéristiques biochimiques de la poche HLA avec laquelle le peptide va interagir. Plus la valeur obtenue est élevée, plus l'affinité du peptide à la poche est forte. Ce logiciel est beaucoup utilisé par l'équipe de Von Knebel Doeberitz, spécialiste de l'étude des réponses T cytotoxiques contre des néopeptides dans les CCR à IMS. Cette équipe est à l'origine de la nomenclature actuelle des néopeptides dans le cadre des cancers à IMS, identifiés pour la plupart grâce à des prédictions *in silico*. Cette nomenclature consiste à attribuer aux néopeptides un numéro en fonction de la chronologie de découverte (01, 02, …, 27, 30, etc.), précédé de la mention FSP pour *frameshift peptide*[438]. Les néopeptides identifiés par l'équipe de Von Knebel Doeberitz sont ensuite validés par des tests fonctionnels pour définir leur caractère immunogène. Dans notre étude, pour caractériser les néopeptides dérivés de la mutation *CASP5(-1)*, nous avons analysé la séquence protéique de la CASP5 mutée avec trois autres logiciels de prédiction en plus du logiciel SYFPETHI. Ces quatre différents logiciels de prédiction ont prédit les peptides KMFFMVFLI et FLIIWQNTM comme étant des peptides HLA-A2.1-restreints, de bonne affinité pour la poche HLA-A2.1, pouvant dériver de la protéine CASP5 mutée. Grâce à la nomenclature de Von Knebel Doeberitz, nous avons pu voir que ces peptides étaient déjà connus et correspondaient respectivement aux peptides FSP25 et FSP26. Ces épitopes, issus de la mutation de CASP5 ont donc été retenus pour notre étude. Ces FSP ne présentant pas d'homologie avec un autoantigène, les différents phénomènes de tolérance du système immunitaire sont donc certainement moins importants pour ces FSP, dérivés d'un néoantigène

et exprimés uniquement par les cellules tumorales, que pour des peptides dérivés d'autoantigènes.

Après nous être assurés de la possibilité de la synthèse d'un néoantigène CASP5(-1) et de la fragmentation de ce néoantigène en néopeptides HLA-A2.1-restreints, des tests fonctionnels ont dû être développés pour confirmer ces prédictions et valider l'immunogénicité potentielle de ces épitopes. Nos CPAA sont un outil de choix pour valider *ex vivo* l'immunogénicité de néopeptides. Grâce à des CPAA, nous avons déjà pu stimuler *in vitro* des LTC spécifiques de néopeptides issus de mutations (-1) des gènes *ASTE1*, *TGFBR2* et *TAF1B*, qui sont des mutations retrouvées à des fréquences très élevées dans les CCR à IMS. Dans cette étude, des CPAA codant le néopeptide FSP25 ($CPAA^{A2.1/FSP25}$), le néopeptide FSP26 ($CPAA^{A2.1/FSP26}$) ou le néoantigène entier CASP5 mutée ($CPAA^{A2.1/CASP5(-1)}$) ont été construites. L'antigène est codé par un vecteur gammarétroviral dicistronique dans lequel le transgène d'intérêt est lié à une séquence codant la puromycine-N-acétyltransférase par un élément IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), permettant la sélection des cellules transduites. Nos CPAA présentent de nombreux avantages puisqu'elles se multiplient rapidement, constituent des lignées stables et sont très facilement transductibles. Elles permettent également d'amplifier une réponse immunitaire cellulaire anti-tumorale spécifique en activant efficacement et de façon reproductible des LTC spécifiques. De plus, les travaux de l'équipe ont fait la preuve que nos CPAA étaient capables de présenter efficacement des peptides directement codés, mais aussi de fragmenter des protéines entières transduites en peptides immunogènes présentés au sein de la molécule HLA-A2.1[412,413].

Nous avons tout d'abord vérifié que les CPAA générées exprimaient bien de manière stable les molécules exprimées à la membrane β2-microglobuline, HLA-A2.1, CD54, CD58 et CD80, et qu'elles étaient résistantes à la puromycine, confirmant la présence de l'antigène d'intérêt dans les CPAA. Les CPAA obtenues ont ensuite été mises en contact avec des LT purifiés à partir du sang périphérique des trois patients atteints de tumeur à IMS mentionnés plus haut et de trois donneurs sains, tous de phénotype HLA-A2+, déterminé au laboratoire. L'immunogénicité des néopeptides a d'abord été évaluée dans des tests de cytotoxicité au ^{51}Cr grâce à des cocultures des LT obtenus avec des cellules T2 (A2.1+) pulsées avec ces peptides puis des lignées cellulaires (A2.1+) dérivées de CCR à IMS présentant ou non la mutation.

Chez tous les donneurs sains et les patients testés, des lyses spécifiques du peptide M1m ont été obtenues, confirmant les résultats antérieurs de l'équipe[412], et nous assurant de la qualité de nos cocultures. Comme attendu, pour les trois donneurs sains, aucune lyse

spécifique de FSP25 et de FSP26 n'a été observée. Ceci peut s'expliquer du fait que les cellules des donneurs sains ne présentaient pas la mutation du gène codant la caspase-5. Les néopeptides FSP25 et FSP26 ne présentant aucune homologie de séquence prédite avec des autoantigènes, les LT anti-FSP25 et anti-FSP26, s'ils sont présents chez ces donneurs sains, sont donc des LT naïfs que nos CPAA ne sont probablement pas capables de stimuler efficacement (jusqu'à présent, nous n'avons jamais pu monter de réponse T spécifique à partir LT n'ayant jamais rencontré *in vivo* leur antigène avec nos CPAA).

Chez le premier patient, aucune lyse spécifique de FSP25 et de FSP26 n'a été non plus observée. Les LT anti-FSP25 et anti-FSP26, s'ils sont présents chez ce patient, sont donc probablement également des LT naïfs que nos CPAA n'ont pas été capables de stimuler efficacement. Cela nous permet d'envisager que la mutation n'a jamais été présente dans la tumeur du patient. Ce patient ne présentant pas de mutation de *CASP5* d'après les PCR multiplexes réalisées sur l'ADN tumoral, l'activation avec nos CPAA de LTC spécifiques de FSP25 et de FSP26 à partir de son sang périphérique aurait suggéré qu'une réponse immunitaire contre les cellules tumorales porteuses de la mutation avait déjà eu lieu au cours du développement de la tumeur, ayant conduit à leur élimination.

Chez le deuxième patient, des réponses cytotoxiques spécifiques de FSP25 ont été observées, mais uniquement avec les CPAA codant directement le peptide. Et nous n'avons pas été capables de monter des réponses cytotoxiques dirigées spécifiquement contre FSP26. Même si bien présentes, il est vrai que les réponses obtenues avec notre contrôle positif M1m et avec FSP25 étaient relativement faibles. Les LT du sang périphérique de ce patient, au moment du prélèvement, étaient peut être peu réactifs, du fait d'une immunodépression liée aux différentes chimiothérapies reçues ou d'un épisode infectieux. Il faut également noter que la mutation du gène de la *CASP5* n'avait été retrouvée que sur 13% des cellules tumorales, ce qui pourrait aussi expliquer, au moins en partie, une réponse faible contre le néoantigène.

Chez le troisième patient, une lyse spécifique de FSP25 a été obtenue pour les LT cultivés avec les $CPAA^{A2.1/FSP25}$, mais aussi pour les LT cultivés avec les $CPAA^{A2.1/CASP5(-1)}$, montrant que nos $CPAA^{A2.1/CASP5(-1)}$ ont bien dégradé l'antigène et présenté le peptide FSP25. Aucune lyse significative de FSP26 n'a été observée pour les LT cultivés avec les $CPAA^{A2.1/FSP26}$ et les $CPAA^{A2.1/CASP5(-1)}$, alors que les réponses obtenues avec notre contrôle positif, M1m, et avec FSP25 étaient relativement fortes. Les meilleures réponses spécifiques ayant été obtenues chez ce patient, une étude fonctionnelle plus complète des LT activés à partir de son sang périphérique a été effectuée. L'étude de la sécrétion d'IFN-gamma a

confirmé les résultats des tests cytotoxiques pour FSP25 puisque nous avons observé une sécrétion d'IFN-gamma contre le peptide FSP25 pour les LT cultivés avec les CPAA$^{A2.1/CASP5(-1)}$ et les CPAA$^{A2.1/FSP25}$. De façon intéressante, malgré la lyse modérée dans les tests cytotoxiques, nous avons également observé une sécrétion d'IFN-gamma contre le peptide FSP26 pour les LT cultivés avec les CPAA$^{A2.1/FSP26}$ et CPAA$^{A2.1/CASP5(-1)}$, montrant que ces CPAA ont bien dégradé l'antigène et présenté le peptide FSP26. Les réponses contre FSP25 et FSP26 plus fortes ici avec les CPAA$^{A2.1/CASP5(-1)}$ qu'avec les CPAA codant directement les peptides pourraient s'expliquer par une meilleure présentation de ces peptides après dégradation de l'antigène entier, comme déjà vu avec d'autres antigènes[412]. Mais ce phénomène n'a pas été observé dans les tests cytotoxiques et il devra être étudié plus précisément ultérieurement. Il faut noter que par spectrométrie de masse, à partir de l'immunoprécipitat des CPAA$^{A2.1/CASP5(-1)}$, nous n'avions pas pu dans la première étude détecter les peptides FSP25 et FSP26, bien que nous ayons la confirmation ici qu'ils sont présentés efficacement par ces CPAA. Une très faible quantité de peptide présentée est donc suffisante pour activer efficacement des LT, et à la surface des CPAA codant une protéine entière passant par toutes les étapes de l'apprêtement de l'antigène, du cytosol à la membrane cytoplasmique en passant par le réticulum endoplasmique, la présentation de cette très faible quantité de peptide pourrait être optimale. Des raisons qui pourraient expliquer que nous n'avons pas pu monter de réponse cytotoxique robuste contre FSP26 sont que cet épitope pourrait ne pas être présenté efficacement par nos CPAA et/ou que cet épitope pourrait ne pas être fortement immunogène en soi. Nous avons malgré tout bien observé une réponse contre FSP26 pour les LT cultivés avec les CPAA$^{A2.1/FSP26}$ et les CPAA$^{A2.1/CASP5(-1)}$ dans nos ELISpots, probablement du fait que cette technique est plus sensible que celle des tests cytotoxiques.

Le résultat majeur de cette étude était certainement la lyse spécifique de la lignée cellulaire tumorale HLA-A2.1+ dérivée d'un CCR à IMS, HCT116, par des LT stimulés avec les CPAA$^{A2.1/FSP25}$, CPAA$^{A2.1/FSP26}$ et CPAA$^{A2.1/CASP5(-1)}$. Les cellules HCT116 présentent donc bien les néopeptides FSP25 et FSP26 qui dérivent de la dégradation du néoantigène CASP5 mutée sur la molécule HLA-A2.1+. La lyse de ces cellules tumorales témoigne d'une NMD absente ou incomplète de *CASP5* muté, et d'une résistance à l'apoptose qui, si elle existe, est incomplète, au moins *in vitro*.

Toutes ces données suggèrent fortement que, *in vivo*, les LT du patient avaient déjà rencontré les néopeptides FSP25 et FSP26, exprimés par ses cellules tumorales, permettant de

monter une réponse immunitaire spécifique mémoire *in vitro* contre ces même néoépitopes. La capacité des LTC activés par nos CPAA à lyser spécifiquement des cellules tumorales de CCR à IMS HLA-A2.1^{+}, montre également que les LT obtenus sont bien anti-tumoraux et pourraient être d'intérêt thérapeutique.

- Conclusion et perspectives -

Afin que des peptides tumoraux soient éligibles pour une immunothérapie spécifique, il faut tout d'abord les identifier, puis valider leur immunogénicité par des tests cellulaires fonctionnels. Dans ce travail, nous avons utilisé deux grandes approches pour l'identification de peptides HLA-restreints. Ces deux approches peuvent d'ailleurs être complémentaires. La première est une approche directe de caractérisation basée sur l'élution des peptides HLA-A2.1-restreints et leur analyse par spectrométrie de masse. La seconde est une approche d'immunologie inverse basée sur des prédictions *in silico* d'épitopes HLA-A2.1-restreints reposant sur des données biochimiques des poches du CMH.

Dans le premier volet de ce travail, nous avons pu établir les conditions pour éluer et identifier des peptides à partir de nos cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA). Nous n'avons pas pu caractériser de peptide d'intérêt à partir de CPAA codant les protéines entières qui faisaient l'objet de ce travail, mais le résultat pourrait être différent avec d'autres protéines immunogènes. Cet outil pourrait également être utile pour caractériser finement les peptides les plus immunogènes, naturels ou modifiés, et enrichir les bases de données des logiciels de prédiction de clivage peptidique, en apportant des données biochimiques permettant d'affiner la précision de ces logiciels. Le résultat majeur de cette étude a été de montrer qu'un peptide non détecté par spectrométrie de masse peut être malgré tout hautement immunogène. Nous sommes certainement dans les limites de sensibilité de la spectrométrie de masse utilisée pour notre analyse, et une technologie plus sensible permettra peut-être de caractériser ce genre de peptide (travaux en cours), auquel cas nos CPAA codant des protéines entières seraient finalement un outil particulièrement intéressant pour la caractérisation de peptides immunogènes. Dans le deuxième volet de ce travail, nous ne sommes pas partis de peptides élués mais de peptides prédits bioinformatiquement. Nous avons pu monter des réponses immunitaires spécifiques contre des néoépitopes prédits *in silico*, ce qui montre que les logiciels de prédiction sont des outils très intéressants également.

Il est important de noter qu'aucune information sur l'immunogénicité des peptides retenus ne peut être obtenue avec ces deux approches, caractérisation de peptides HLA-restreints par spectrométrie de masse ou prédiction d'affinité de peptides putatifs pour une poche HLA donnée grâce à des logiciels bioinformatiques. Ce n'est pas parce qu'un peptide est présenté et qu'il est extrêmement affin pour une poche du CMH qu'il va être immunogène. L'idée qu'un peptide caractérisé puisse ne pas être immunogène repose sur les notions de

tolérance immunitaire. La tolérance immunitaire est la capacité du système immunitaire à ne pas réagir contre un antigène avec lequel il a déjà été en contact. Le grand exemple est celui des autoantigènes de forte affinité. Normalement, dans le thymus, lors du processus de différenciation des LT, la tolérance centrale conduit à la délétion clonale des LT hautement réactifs contre des autoantigènes. Ceci permet d'éviter des réponses autoimmunes en périphérie. Pour un peptide de très forte affinité identifié par les deux approches utilisées, s'il dérive d'un autoantigène, les LT le reconnaissant auront donc été délétés dans le thymus. Nous ne nous attendons donc pas à des réponses contre de tels peptides. Pour les autres autoantigènes, dont les TCR autoréactifs n'auront pas été éliminés dans le thymus, des mécanismes de tolérance périphérique tels que l'anergie (liée à une stimulation du LT *via* son TCR en l'absence de signaux de costimulation) ou l'ignorance (liée à la présence de l'antigène dans un site immunoprivilégié) sont mis en place.

Grâce à nos CPAA, nous pouvons déterminer l'immunogénicité des antigènes étudiés. Nous pouvons analyser finement les réponses contre des peptides particuliers, naturels ou modifiés, avec des CPAA qui les codent précisément. Nous pouvons analyser de façon plus générale la réponse contre des antigènes entiers, avec des CPAA qui les codent intégralement. Nos CPAA, dans les deux cas, présentent efficacement des épitopes antigéniques sur les molécules de HLA-A2.1. Avec des techniques de spectrométrie de masse plus sensibles, nos CPAA nous permettront peut-être un jour d'aller jusqu'à la caractérisation de peptides dérivés de protéines entières.

L'utilisation de nos CPAA, dans le cadre du développement d'approches d'immunothérapie spécifique personnalisée est très prometteuse. Les seules CPAA utilisées actuellement en clinique ont été générées à partir d'une lignée cellulaire dérivée d'une érythroleucémie humaine, K562[273]. Cette lignée cellulaire est décrite comme étant CMH-déficiente. En réalité, elle n'exprime pas les molécules HLA de classe I A et B, et les molécules HLA de classe II, notamment DR, mais elle exprime de façon endogène des molécules HLA-C[273]. De plus, elle exprime des antigènes mineurs, qui sont des protéines polymorphes qui peuvent être hautement immunogènes. D'ailleurs, des expériences réalisées par le Docteur Jean-Baptiste Latouche au *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* de New-York avec des CPAA générées à partir de cellules K562 ont permis de documenter des réactions allogéniques majeures, soit directes, médiées probablement par les molécules C du CMH de classe I (les cellules K562, même non transduites avec une molécule HLA, sont déjà très alloréactives), soit indirectes, médiées probablement par des antigènes mineurs présentés

sur la molécule du CMH transduite, en l'occurrence HLA-A2.1. Avec nos CPAA, générées à partir de fibroblastes murins NIH/3T3, l'activation de LT non spécifiques ou de spécificité non voulue, liée à leur xénoréactivité, est en réalité beaucoup moins importante qu'avec les CPAA générées à partir de cellules humaines K562, liée à leur alloréactivité. La xénoréactivité directe de nos CPAA est même inexistante car lors d'une coculture de LT de donneurs sains ou de patients avec des fibroblastes murins NIH/3T3 n'exprimant pas de molécule HLA, aucune activation T n'est observée. Par contre, lorsque la molécule HLA-A2.1 est exprimée par nos cellules NIH/3T3, il y a une réactivité, probablement *via* des peptides xénogéniques présentés sur cette molécule. Jusqu'à présent, nous ignorions ce qui était présenté exactement par nos CPAA sur les molécules HLA-A2.1, en dehors des peptides d'intérêt. Avec les travaux réalisés dans le premier volet de cette thèse, nous savons à présent que la xénoréactivité observée avec nos CPAA pourrait venir de la présentation de nombreux peptides autres que ces peptides d'intérêt sur les molécules HLA-A2.1 qu'elles expriment, dérivés notamment de protéines murines ou de protéines du sérum. Pour optimiser la présentation d'un peptide immunogène donné par nos CPAA et réduire leur xénoréactivité, nous pourrons bloquer la machinerie TAP de CPAA codant directement ce peptide, adressé dans le réticulum endoplasmique (ce qui n'est pas envisageable avec des CPAA codant un antigène entier). Dans le cadre du développement de travaux précliniques, comme précisé précédemment, nos CPAA sont irradiées avant coculture, évitant ainsi tout risque de contamination de nos cultures de LT par ces cellules. Dans l'optique de pouvoir proposer un jour une approche clinique d'immunothérapie cellulaire adoptive basée sur l'utilisation de nos CPAA, nous collaborons avec les Professeurs Nathalie Labarrière et François Lang, au sein de l'unité Inserm UMR892 de Nantes, pour la mise au point d'un système de purification de LT de grade clinique reposant sur l'utilisation de monomères HLA-peptide spécifiques couplés à des billes magnétiques, nous préservant ainsi de tout problème de xénoréactivité. Les travaux sur la purification de LT spécifiques sont au cœur du projet de thèse d'Estelle Dupel au sein de l'équipe. Ils nous permettront, nous l'espérons, d'obtenir une population de LT de spécificité parfaitement contrôlée, dépourvue des effets potentiellement délétères de LT non spécifiques ou de spécificité non voulue. La caractérisation précise du phénotype et de la fonction de ces LT devra également être effectuée, puis leur capacité à lyser des cellules tumorales autologues devra être vérifiée. Même si nos CPAA ne sont pas utilisées un jour en clinique, la caractérisation précise qu'elles permettent, dans le cadre des CCR à IMS, des néopeptides et de leur immunogénicité, nous aidera, nous l'espérons, à sélectionner les

peptides de plus grand intérêt thérapeutique pour d'autres approches d'immunothérapie cellulaire adoptive spécifique. Dans le cadre de la mise en place d'une thérapie vaccinale, nos CPAA pourraient également être un outil précieux pour sélectionner les protéines et les peptides qui en dérivent, les plus immunogènes. Dans une telle approche, une vaccination avec des peptides immunogènes identifiés, HLA-restreints, pourrait être envisagée. Il pourrait même être intéressant de ne pas se limiter à des peptides HLA-restreints, mais d'envisager l'utilisation de peptides plus longs, voire de protéines entières, permettant ainsi aux CPA de l'individu de sélectionner les peptides qui seront présentés.

En outre, nous sommes conscients du fait qu'il n'y a pas que la réponse CD8 cytotoxique qui est importante *in vivo*. Le rôle majeur des LT $CD4^+$ est à prendre en compte. L'équipe développe donc également des CPAA de classe II (exprimant DR1, 11, 15 ou 51 pour l'instant) afin d'activer efficacement des LT CD4 anti-tumoraux. A notre connaissance, des protocoles permettant de stimuler de manière simple et reproductible des LT $CD4^+$ sont inexistants. Pour le moment, les travaux d'optimisation des CPAA classe II sont effectués principalement dans un contexte HLA-DR1 avec un peptide immunogène dérivé de l'hémagglutinine. Des études réalisées avec des CPAA pulsées avec un peptide dérivé de l'hémagglutinine ou la protéine entière hémagglutinine elle-même, ont déjà permis d'obtenir des résultats très prometteurs[417]. L'équipe travaille actuellement sur la présentation d'antigènes endogènes, codés par nos CPAA de classe II, sur les molécules du CMH-II qu'elles expriment. Ce projet, aux résultats préliminaires très prometteurs, font l'objet du travail de thèse d'Alexandre Couture au sein de l'équipe. Les outils développés lors de ce travail de thèse pourront être utilisés avec ces nouvelles CPAA. Nous espérons que nous serons en mesure très bientôt, avec ces CPAA de classe II, dans le cadre des CCR à IMS, comme nous le faisons actuellement dans un contexte HLA-I, de caractériser par spectrométrie de masse de nouveaux peptides HLA-II-restreints et d'évaluer l'immunogénicité de ces peptides ou de peptides HLA-II-restreints prédits.

Nos CPAA, qu'elles soient de classe I ou de classe II, sont donc des outils de choix pour le développement, ici dans le cadre des CCR à IMS, de nouvelles approches d'immunothérapie cellulaire adoptive ou d'immunothérapie vaccinale, permettant l'amplification de lymphocytes T anti-tumoraux d'intérêt thérapeutique ou l'identification des néoantigènes (protéines entières ou peptides) les plus immunogènes à cibler *in vitro* ou *in vivo*.

Annexe 1

Cette annexe présente de précédents travaux de l'équipe sur l'étude de l'infiltrat lymphocytaire et l'activation de lymphocytes T périphériques de patients contre des néopeptides dans le cadre des cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire. Ces travaux, auxquels j'ai participé, notamment pour ce qui est de l'activation de lymphocytes T cytotoxiques anti-néopeptides, ont donné lieu à une publication dans *Cancer Research*. Les résultats très encourageants de ces travaux ont été à la base de l'initiation du deuxième volet du travail de cette thèse sur la *CASP5*.

Microenvironment and Immunology

Cancer Research

Correlation between Density of CD8$^+$ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy

Pauline Maby[1], David Tougeron[1,2,3], Mohamad Hamieh[1], Bernhard Mlecnik[4,5,6], Hafid Kora[1], Gabriela Bindea[4,5,6], Helen K. Angell[4,5,6,7], Tessa Fredriksen[4,5,6], Nicolas Elie[8], Emilie Fauquembergue[1], Aurélie Drouet[1], Jérôme Leprince[9], Jacques Benichou[10], Jacques Mauillon[11,12], Florence Le Pessot[13], Richard Sesboüé[1], Jean-Jacques Tuech[14], Jean-Christophe Sabourin[1,13], Pierre Michel[15], Thierry Frébourg[1,11], Jérôme Galon[4,5,6], and Jean-Baptiste Latouche[1,11]

Abstract

Colorectal cancers with microsatellite instability (MSI) represent 15% of all colorectal cancers, including Lynch syndrome as the most frequent hereditary form of this disease. Notably, MSI colorectal cancers have a higher density of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) than other colorectal cancers. This feature is thought to reflect the accumulation of frameshift mutations in sequences that are repeated within gene coding regions, thereby leading to the synthesis of neoantigens recognized by CD8$^+$ T cells. However, there has yet to be a clear link established between CD8$^+$ TIL density and frameshift mutations in colorectal cancer. In this study, we examined this link in 103 MSI colorectal cancers from two independent cohorts where frameshift mutations in 19 genes were analyzed and CD3$^+$, CD8$^+$, and FOXP3$^+$ TIL densities were quantitated. We found that CD8$^+$ TIL density correlated positively with the total number of frameshift mutations. TIL densities increased when frameshift mutations were present within the *ASTE1*, *HNF1A*, or *TCF7L2* genes, increasing even further when at least one of these frameshift mutations was present in all tumor cells. Through *in vitro* assays using engineered antigen-presenting cells, we were able to stimulate peripheral cytotoxic T cells obtained from colorectal cancer patients with peptides derived from frameshift mutations found in their tumors. Taken together, our results highlight the importance of a CD8$^+$ T cell immune response against MSI colorectal cancer–specific neoantigens, establishing a preclinical rationale to target them as a personalized cellular immunotherapy strategy, an especially appealing goal for patients with Lynch syndrome. *Cancer Res; 75(17); 3446–55. ©2015 AACR.*

Introduction

Colorectal cancers with high density of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), especially of CD8$^+$ T lymphocytes (TL), are associated with a better prognosis (1–4), suggesting that a cytotoxic antitumor immune response could control colorectal cancer progression. Cytotoxic immune response is part of a complex immune reaction that includes different cell types, one of them being regulatory T cells (Tregs). Tregs are commonly characterized by the expression of the transcription factor FOXP3 and can suppress cytotoxic TL (CTL) activities.

Colorectal cancers with microsatellite instability (MSI) represent around 15% of colorectal cancers, including Lynch syndrome, the most frequent hereditary form of colorectal cancer. MSI colorectal cancers are due to a defect of the DNA mismatch repair (MMR) system, leading to accumulation of mutations within DNA repeat sequences. Overall, MSI colorectal cancers are known to have a better prognosis (5–8) and a more dense infiltration of intraepithelial activated CD8$^+$ TLs than microsatellite stable (MSS) colorectal cancers (9–13), suggesting that MSI colorectal cancers are particularly prone to a local cytotoxic cellular immune response. The link between stronger immunogenicity of MSI colorectal cancers and MMR deficiency is commonly explained by the accumulation of frameshift mutations within coding sequences and the synthesis of neoantigens (14). Degradation of such neoantigens can release immunogenic neopeptides, presented by human leukocyte antigen class I (HLA-I) molecules, on the tumor cell surface, and targeted by a specific CD8$^+$ cellular immune response. *In vitro*, TLs from MSI colorectal cancer patients have already been activated against some

[1]Inserm U1079, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France. [2]Department of Gastroenterology, Poitiers University Hospital, Poitiers, France. [3]Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines, Poitiers University, Poitiers, France. [4]Inserm U1138, Laboratory of Integrative Cancer Immunology, Paris, France. [5]Université Paris Descartes, Paris, France. [6]Cordeliers Research Centre, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris, France. [7]AstraZeneca Pharmaceuticals, Alderley Park, Cheshire, United Kingdom. [8]Imaging Core Facility, CMABIO, Caen University Hospital, Caen, France. [9]Inserm U982, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen University, France. [10]Biostatistics Unit, Inserm U657, Rouen University Hospital, Rouen University, Rouen, France. [11]Department of Genetics, Rouen University Hospital, Rouen, France. [12]Department of Gastroenterology, Le Havre Hospital, Le Havre, France. [13]Department of Pathology, Rouen University Hospital, Rouen, France. [14]Department of Digestive Surgery, Rouen University Hospital, Rouen, France. [15]Department of Gastroenterology, Rouen University Hospital, Rouen, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (http://cancerres.aacrjournals.org/).

Corresponding Author: Jean-Baptiste Latouche, Rouen University Hospital, 22 boulevard Gambetta, Rouen 76183, France. Phone: 33-232880397; Fax: 33-235148237; E-mail: jean-baptiste.latouche@chu-rouen.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3051

©2015 American Association for Cancer Research.

frameshift mutation-derived peptides (FSP), underlining that such neopeptides could indeed be immunogenic (15).

We have previously shown, in 52 MSI colorectal cancers, that frameshift mutation number and spectrum correlated with total ($CD3^+$) TIL density (16). However, to our knowledge, the direct link between frameshift mutations in MSI tumor cells and TIL subpopulation densities has never been shown.

A total of 103 MSI tumors, from two independent series, were analyzed for the correlation between frameshift mutations within 19 selected MSI target genes and $CD3^+$, $CD8^+$, and $FOXP3^+$ TIL densities. We found that $CD8^+$ TIL density correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. Furthermore, we provided evidence that specific CD8 cytotoxic antitumor T-cell responses could be mounted *in vitro* against frameshift mutations present in patients' tumors, paving the way for developing new personalized immunotherapy strategies.

Materials and Methods

Tumor samples

For the main series, colorectal tissues were collected from 106 MSI colorectal cancer surgical specimens, at Rouen University Hospital, Rouen, France, between 2003 and 2009. This series included 26 Lynch patients (7 with *MLH1* mutation, 15 with *MSH2* mutation, 3 with *MSH6* mutation, and 1 without MMR gene mutation detected). In agreement with French regulation, all patients gave a written consent for the MMR gene germline mutation analyses.

For each patient, genomic DNA was extracted from paired tumor and normal colorectal tissues as previously described (16).

For the validation series, colorectal tissues and genomic DNA were collected from 35 MSI colorectal cancer patients who underwent a primary resection of their tumor at the Laennec-HEGP Hospitals, Paris, between 1996 and 2004, as previously described (1).

Ethical, legal, and social implications of the study were approved by ethical review boards. All experiments were performed according to the Helsinki guidelines.

Microsatellite instability assessment and determination of tumor cell proportion within the tumor samples

MSI was defined as an instability affecting at least two, among the five, consensus mononucleotide repeats (BAT25, BAT26, NR21, NR22, and NR24; ref. 17) within tumor DNA, compared with normal colon DNA. PCR products were separated on an ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems).

As previously described (16), to evaluate the proportion of tumor cells within each tumor sample, the profile corresponding to the most unstable microsatellite was selected. The proportion of tumor cells within a tumor sample was given by the area of the unstable part of this microsatellite profile, divided by the total area of this microsatellite profile (Fig. 1A).

Detection of frameshift mutations in target genes: fluorescent multiplex PCRs

As previously described (16), two fluorescent multiplex PCRs were performed on paired normal and tumor DNA samples. In brief, 22 short coding repeat in 19 genes were simultaneously PCR-amplified and separated on an ABI Prism 3100 DNA sequencer. For each patient, the patterns generated from tumor and paired nonmalignant colorectal tissue DNAs were superimposed. Shifts in the lengths of PCR products corresponded to nucleotidic deletions or insertions (i.e., frameshift mutations).

We evaluated the proportion of cells harboring each mutation within the tumor sample: for each mutation, on the PCR profile obtained from tumor DNA sample, the area corresponding to mutated DNA was divided by the total area, corresponding to mutated and not mutated DNA. If this percentage was similar to the percentage of malignant cells in the sample, we concluded that this frameshift mutation was present in all tumor cells, given that chromosomal instability is extremely rare in MSI colorectal cancers (18, 19; Fig. 1B). PCRs were performed when both tumor and normal DNA could be obtained (for 87 patients from the main series and the 35 patients from the validation series).

Percentage of mutations within a tumor was given by the number of mutated genes divided by the number of analyzed genes.

Tissue microarray, immunohistochemistry, and TIL quantification

Tissue microarrays (TMA) were constructed for 86 of the 106 patients from the main series (for some patients, no tumor tissue was available). Tissue cores of 0.6-mm diameter were inserted in recipient paraffin blocks. Four cores were taken at the tumor center, four at the invasion margin, and four from distant histologically normal colonic mucosa (Tissue Arrayer). Four-micrometer-thick sections from these TMA blocks were used for immunohistochemistry staining of $CD3^+$, $CD8^+$, and $FOXP3^+$ cells, as previously described (20), with mouse monoclonal primary anti-CD3, anti-CD8 (Dako), and anti-FOXP3 (AbCam) antibodies. Ventana Bench Mark XT IHC/ISH Staining Module (Ventana Medical Systems) was used according to the manufacturer's recommended protocol. Each slide, scanned with Mirax Scan (Zeiss Systems), was analyzed as already described (20), with the Chips'N Cheap TMA analysis program, using Aphelion 3.2 software (ADCIS), further optimized for this purpose. On each chip, outside of the mucinous and the lymphoid areas, we manually delineated epithelium and stroma. Percentages of antibody-labeled surfaces were then automatically calculated (Fig. 2). For the validation series, different tissue-arraying instrument (Beecher Instruments, Alphelys), anti-CD3 and anti-CD8 monoclonal antibodies (AbCam), and image analysis system (Spot Browser, Alphelys) were used as previously described (1). The density was recorded as the number of positive cells per tissue surface area unit.

Construction of artificial antigen presenting cells expressing FSPs

As previously described (21), NIH/3T3 fibroblasts were sequentially transduced with five replication-defective gamma-retroviral vectors encoding HLA-A*0201 (A*0201 heavy chain and human β2-microglobulin), and three human costimulatory molecules ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58), and B7.1 (CD80). These artificial antigen presenting cells (AAPC) were then transduced with a dicistronic vector encoding a puromycin-resistance element and one of the following frameshift peptides: RLSSCVPVA, GMCVKVSSI, and VLRTEGEPL, called FSP02 (22), FSP27, and FSP30 (23). The high affinity of these peptides for the

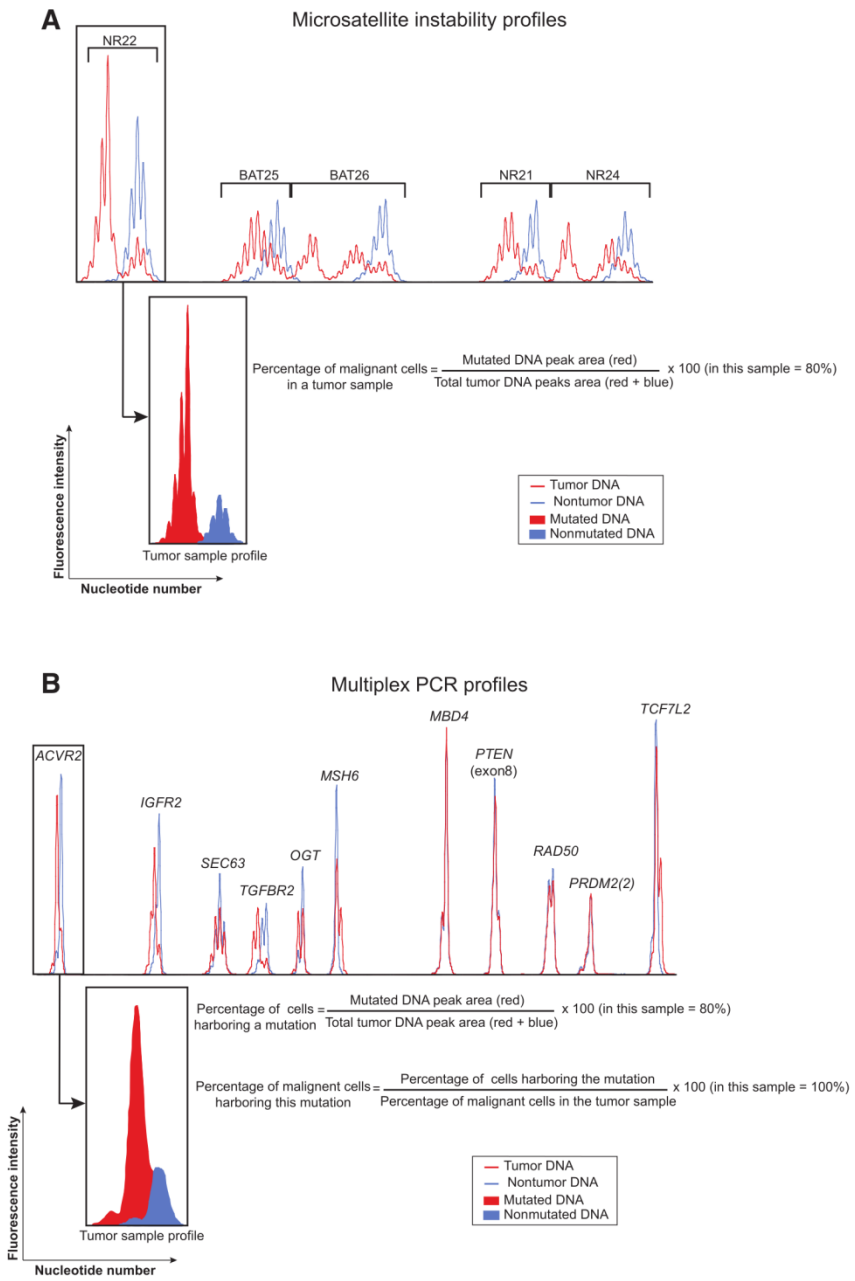


Figure 1.
Fluorescent multiplex PCR frameshift mutation analysis. A, MSI status was determined with five consensus mononucleotide repeats (BAT25, BAT26, NR21, NR22, and NR24). For this tumor, all five markers were unstable. To evaluate the percentage of tumor cells within the tumor sample, on the most unstable microsatellite, the area corresponding to mutated DNA was divided by the total area of this microsatellite tumor profile. B, frameshift mutations were characterized based on multiplex PCR profiles. To detect frameshift mutations, mononucleotide repeats of 19 genes were simultaneously amplified in two multiplex PCRs. Tumor and nontumor DNA sample profiles were superimposed and shifts between profiles were identified. For this tumor, one of the two multiplex PCRs revealed that *ACVR2*, *IGFR2*, *SEC63*, *TGFBR2*, *OGT*, *MSH6*, and *TCF7L2* were mutated. To evaluate the percentage of cells harboring a given mutation [here a (−1) mutation in *ACVR2*] within a tumor sample, the area corresponding to mutated DNA was divided by the total area of this gene tumor profile. The percentage of cells harboring the given mutation divided by the percentage of tumor cells in the tumor sample gives the proportion of tumor cells harboring this mutation.

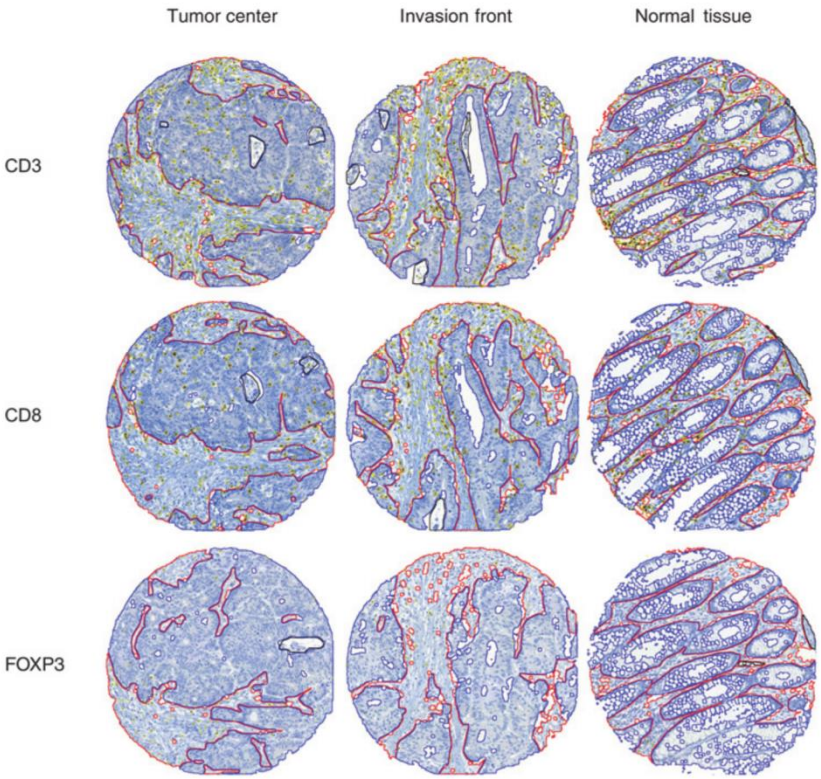


Figure 2.
CD3$^+$, CD8$^+$, and FOXP3$^+$ tumor-infiltrating lymphocytes in the tumor center, the invasion front, and an associated normal tissue. For each region, four cores (0.6 mm of diameter) were stained with anti-CD3, anti-CD8, or anti-FOXP3 antibody and revealed by peroxidase reaction. The regions of interest (stroma in red and epithelium in blue) and the excluded areas (black) were manually delineated. Immunostained areas were automatically calculated and circled in yellow. For each region, representative cores from the same tissue sample are shown.

HLA-A*0201 molecule was validated using the SYFPEITHI algorithm (24).

Each peptide coding sequence was cloned downstream of the human CD8α leader sequence, for the peptide to be addressed into the endoplasmic reticulum. AAPCs expressing these peptides were selected with puromycin (Sigma-Aldrich) at 8 μg/mL for 1 week.

Peripheral TL purification and stimulation of antigen-specific CTLs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HLA-A*02$^+$ colorectal cancer patients and healthy donors (HLA phenotype assessed in the laboratory) were used upon informed consent and agreement of the local ethic committee. PBMCs were collected by density centrifugation on a lymphocyte separation medium (Eurobio). The next day, nonactivated TLs were negatively sorted using Dynabeads untouched human T cell kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Irradiated AAPCs (25 Gy) were plated (10^5 per well) in a 24-well plate the day before as previously described (25). T cells were added (1×10^6 per well) to the AAPCs and cultured for 21 days. A second stimulation was performed for 14 days: irradiated AAPCs were plated as for the first stimulation and 3×10^5 T cells were added per well. IL-2 (Proleukin Chiron) was added at 20 IU/mL to the cocultures every second day from the seventh day of coculture.

Cytotoxicity assays

As previously described (25), standard ^{51}Cr release assays were performed using HLA-A*0201$^+$ T2 cells (ATCC) loaded with the different peptides (irrelevant, FSP02, FSP27, and FSP30, synthesized by Rouen University Proteomic Platfrom, IRIB, Inserm U982, France), at 10 μmol/L for 1 hour at room temperature, or using HLA-A*0201$^+$ HCT116 and Colo205 colorectal cancer–derived cell lines (ATCC) incubated 24 hours with IFNγ (Imukin) at 200 IU/mL. T2, HCT116, and Colo205 target cells were labeled with ^{51}Cr (for 1 hour at 37°C). A total of 5×10^3 target cells were used per well in 96-well U-bottomed plates at different effector to target (E:T) ratios and incubated at 37°C, for 4 hours for the T2 cells, and 18 hours for the colorectal cancer cell lines.

Statistical analyses

Associations between dichotomous characteristics (e.g., presence or absence of frameshift mutations) and continuous variables (e.g., cell densities) were assessed using the Mann–Whitney nonparametric test. Correlations between quantitative variables (e.g., TIL densities and number of frameshift mutations) were assessed using Spearman's rank correlation coefficient. The Kruskal–Wallis *post hoc* test was used for pairwise comparisons among three groups.

To select the frameshift mutations associated with tumor infiltration, among 19 studied genes, while accounting for multiple testing, the following procedure was used: a mutation was deemed correlated with TIL density if it was associated with an increased infiltration in at least two among four independent tumor compartments (i.e., epithelium in tumor center, epithelium in invasion front, stroma in tumor center, stroma in invasion

front) at the 0.05 level using the Mann–Whitney test. This way, the probability to find, only by chance, a mutation associated with TIL density was lower than 5%.

Results

Frameshift mutation number is highly variable but associated with age and some histopathological features

We studied the mutational status of coding repeat sequences within 19 selected genes by performing comparative multiplex PCRs on tumor and normal colon tissues of 122 MSI tumors from two independent series (Fig. 1). Most of the frameshift mutations were single nucleotide deletions (>95%) within the studied mononucleotidic repeat sequences. As previously reported (16), *ACVR2*, *TAF1B*, *ASTE1*, and *TGFBR2* were the most frequently mutated genes (in more than 75% of MSI colorectal cancers). Moreover, in 30% or more of the tumors harboring mutations in *ACVR2*, *TGFBR2*, and *ASTE1* genes, these given genes were mutated in all malignant cells, whereas *TAF1B* almost never was (1/99; Supplementary Table S1).

Number of frameshift mutations was correlated with age and some histopathological characteristics, notably the VELIPI (Vascular emboli, lymphatic invasion and perinervous invasion) criteria (Supplementary Table S2), and was highly variable from a tumor to another, ranging from 0 to 18 mutation(s) among the 22 analyzed repeat sequences. No association was found between mutation number and MMR gene status (data not shown).

The median number of frameshift mutations per tumor was 9 for the main series and 11 for the validation one.

TIL density is highly variable but associated with frameshift mutation number

In 86 tumors from the main series (for some patients, no tumor tissue was available) and 35 tumors for the validation series, $CD3^+$, $CD8^+$, and $FOXP3^+$ TILs were quantified in the tumor center, the invasion front and in nonmalignant distant tissue, using TMAs (Fig. 2). For the 52 patients included in both our previous study (16) and this one, $CD3^+$ T cell density found on TMAs was correlated ($P = 0.0001$) with the ones previously found on representative fields of whole slides, confirming the reliability of this TMA-based analysis (Supplementary Fig. S1). For the 35 tumors from the validation series, $CD3^+$, $CD8^+$, and $FOXP3^+$ TILs were quantified in the tumor center and the invasion front, using another TMA-based analysis system (as mentioned in Material and Methods), which reliability had also been previously verified on 230 colorectal tumors ($P < 0.0001$, data not shown).

TIL densities highly differed between tumors, ranging from 0.16% to 16.5% for CD3, 0.06% to 13% for CD8, and 0.03% to 1.18% for FOXP3 in the main series (percentages of antibody-labeled surfaces), and from 44 to 1,320 cells/mm^2 for CD3, 10 to 1,020 cells/mm^2 for CD8, and 0 to 127 cells/mm^2 for FOXP3 in the validation series.

Looking for correlations between TIL densities in whole tumor tissues and increasing frameshift mutation percentages, we found that, in both series, only $CD8^+$ TIL density significantly increased with the percentage of frameshift mutations (Fig. 3 and Supplementary Fig. S2A). There was a tendency for $CD3^+$ TIL density to increase with this percentage, whereas $FOXP3^+$ TIL density was not higher in tumors containing more mutations.

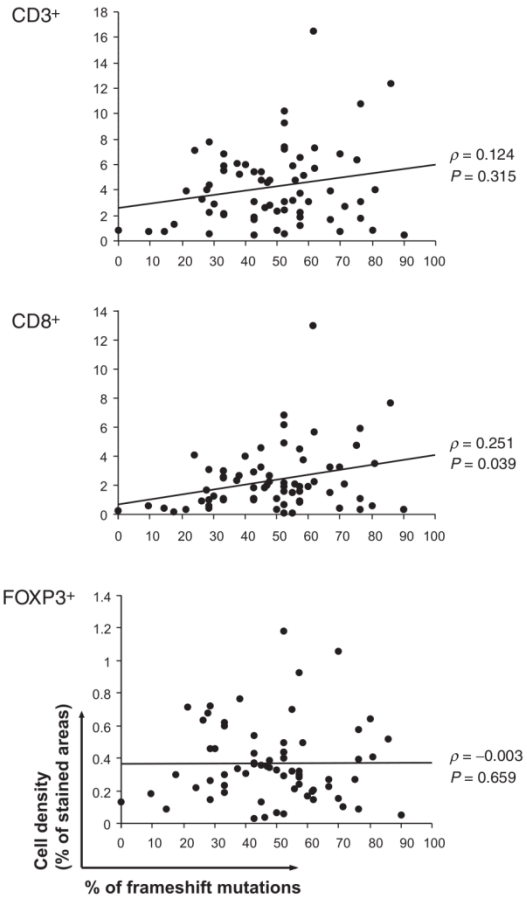


Figure 3.
Associations between frameshift mutation percentages and $CD3^+$, $CD8^+$, and $FOXP3^+$ tumor-infiltrating lymphocyte densities. For 68 patients, the *x*-axis gives the percentage of mutations found within the 22 studied coding repeat sequences and the *y*-axis gives the percentage of total stained areas calculated from TMA immunostained cores (Spearman tests).

ASTE1, *HNF1A*, and *TCF7L2* frameshift mutations are associated with higher $CD8^+$ TIL densities

In the main series, we looked for unbiased robust associations between frameshift mutations in each of the 19 selected genes and $CD3^+$, $CD8^+$, and $FOXP3^+$ TIL densities. We found that frameshift mutations of *ASTE1*, *HNF1A* (also known as *TCF1*), and *TCF7L2* (also known as *TCF4*) genes were correlated with an increased $CD8^+$ TIL density ($P < 0.05$ in at least two among four independent compartments, that is, epithelium in tumor center, epithelium in invasion front, stroma in tumor center, stroma in invasion front). *ASTE1* frameshift mutation was also correlated with an increased $CD3^+$ TIL density ($P < 0.05$ in at least two among four independent compartments). On the contrary, these mutations were associated neither with $FOXP3^+$ infiltration in any compartment, nor with $CD3^+$ or $CD8^+$ infiltration in normal tissue compartments (Table 1).

Table 1. Associations between somatic frameshift mutations and CD3$^+$, CD8$^+$, and FOXP3$^+$ TIL densities

	CD8			CD3	FOXP3
	ASTE1	*HNF1A*	*TCF7L2*	*ASTE1*	These three genes
Tumor center (TC)					
Epithelium (E)	0.010	0.049	0.015	0.016	ns
Stroma (S)	ns	0.026	0.012	ns	
E + S	0.021	0.016	0.007	ns	
Invasion front (IF)					
Epithelium	ns	ns	ns	0.030	ns
Stroma	0.030	ns	ns	0.044	
E + S	0.040	ns	ns	0.032	
TC + FI					
Epithelium	0.012	ns	ns	0.010	ns
Stroma	ns	ns	0.040	ns	
E + S	0.011	ns	ns	ns	
Normal tissue					
Epithelium		ns		ns	ns
Stroma					
E + S					

NOTE: *P* values are given for the frameshift mutations in *ASTE1*, *HNF1A*, and *TCF7L2* genes, which were deemed robustly correlated with CD8$^+$ TL density, that is, significantly associated with an increased CD8$^+$ density in at least two tumor compartments among the four following ones: tumor center (TC), epithelium (E) and stroma (S), and invasion front (IF) E and S (Mann–Whitney tests). ns, not significant; gray highlights, cell density significantly higher when the given gene is mutated.

ACVR2 frameshift mutation was associated with an increased CD3$^+$ TIL density ($P = 0.02$ for the tumor center epithelium and $P = 0.03$ for the invasion front stroma). No mutation was associated with an increased FOXP3$^+$ infiltration.

Then we focused on the mutations correlated with CD8$^+$ TIL density. CD8$^+$ infiltration was significantly higher in tumors mutated in at least *ASTE1*, *HNF1A*, or *TCF7L2* gene compared with tumors with no mutation in these genes (Fig. 4A). Moreover, in all tumor compartments, CD8$^+$ TIL density further increased when at least one of *ASTE1*, *HNF1A*, and *TCF7L2* genes was mutated in all tumor cells, many pairwise comparisons being significant (Fig. 4B). The same tendency was observed for CD3$^+$ cell infiltration, although with less strong associations, but not for FOXP3$^+$ cell infiltration (data not shown).

In the validation series, only two patients were non-mutated on *ASTE1*, excluding this gene from further statistical analysis. Nevertheless, the tumors were still significantly more infiltrated with CD8$^+$ T cells when at least *HNF1A* or *TCF7L2* was mutated ($P = 0.049$ in the total tumor tissue), especially at the invasion front (Supplementary Fig. S2B) with a more dense infiltration when all tumor cells were mutated (Supplementary Fig. S2C).

Patients' peripheral CD8$^+$ TLs can be activated against neopeptides derived from frameshift mutations present in their tumor

We then tested whether tumor-specific frameshift mutations could indeed be immunogenic in MSI colorectal cancers. Therefore, we developed a functional assay based on *in vitro* peripheral specific CTL activation with AAPCs, expressing the most frequent HLA class I molecule (A*0201), the main costimulatory molecules, ICAM-1, LFA-3, and B7.1 (21), and tumor-specific frameshift peptides.

The first HLA-A*02$^+$ MSI colorectal cancer patient (P1) included in this functional study was a 27-year-old Lynch patient. In P1's tumor, we detected (−1) mutations in coding repeat sequences of *TGFBR2*, *TAF1B*, and *ASTE1* genes (Fig. 5A), leading to the putative synthesis of the following neopeptides of high affinity for HLA*A0201: RLSSCVPVA (FSP02), GMCVKVSSI (FSP27), and VLRTEGEPL (FSP30). Therefore, we constructed A*0201-restricted AAPCs expressing these frameshift peptides (AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/FSP27}$, and AAPC$^{A2.1/FSP30}$; Fig. 5B). After two cocultures with AAPCs encoding FSP02, FSP27, or FSP30, P1's peripheral CTLs could specifically lyse T2 cells pulsed with the corresponding peptide (Fig. 5C). Moreover, peripheral CTLs stimulated with AAPC$^{A2.1/FSP02}$ or AAPC$^{A2.1/FSP30}$ could specifically lyse the HLA-A*0201$^+$ MSI colorectal cancer cell line HCT116, which harbors the same mutations as P1 in *TGFBR2* and *ASTE1* genes. On the contrary, peripheral CTLs stimulated with AAPC$^{A2.1/FSP27}$ did not lyse HCT116 cells, which do not harbor the same mutation as the patient in *TAF1B* gene (Fig. 5D).

We performed similar experiments on another MSI HLA-A*02$^+$ Lynch patient (P2, 39-year-old), whose tumor harbored the (−1) *TGFBR2* and (−1) *TAF1B* frameshift mutations, but not the *ASTE1* (−1) mutation. After two stimulations, P2's peripheral CTLs could specifically lyse T2 cells pulsed with FSP02 and FSP27, but not T2 cells pulsed with FSP30. Moreover, peripheral CTLs stimulated with AAPC$^{A2.1/FSP02}$ could specifically lyse HCT116 cells (Supplementary Fig. S3A).

Functional assays were also performed on four HLA-A*02$^+$ additional donors: an MSI colorectal cancer Lynch patient (P3, 49-year-old), an MSS colorectal cancer patient (49-year-old), and two healthy donors (26- and 47-year-old). In the tumors of both colorectal cancer patients, we did not detect mutations in *TGFBR2*, *TAF1B*, and *ASTE1* genes. We cocultured their peripheral TLs with AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/FSP27}$, AAPC$^{A2.1/FSP30}$, and AAPC$^{A2.1}$ encoding M1m (AAPC$^{A2.1/M1m}$). M1m is a peptide derived from MART-1, a melanocyte auto-antigen. Here, AAPC$^{A2.1/M1m}$ were used to ascertain TL functionality, because they can easily activate anti-M1m TLs *in vitro* (25). After two rounds of stimulation on the corresponding AAPCs, TLs from these four donors were cytotoxic against T2 cells pulsed with M1m, but not against T2 cells presenting FSP02, FSP27, or FSP30 (Supplementary Fig. S3B).

Discussion

In this study, we showed that *ACVR2*, *TAF1B*, *TGFBR2*, and *ASTE1* genes harbored frameshift mutations in the majority of the MSI colorectal tumors (>75%), confirming results previously obtained on a smaller series (16).

To determine whether frameshift mutations could lead to an increased density of different TL populations in MSI colorectal cancers, we studied CD3$^+$, CD8$^+$, and FOXP3$^+$ TILs on 103 patients from two independent series, using TMAs.

CD4$^+$ TLs represent a major TIL population, which includes both helper and regulatory T cells, but, unfortunately, they had to be kept out of the scope of this work, as it is often the case when large series of patients are studied by immunohistochemistry (1, 2, 12, 26). Indeed, as many groups and as previously discussed (20), we could not find any anti-CD4 antibody allowing a staining of good enough quality, exploitable with a digital image analysis software.

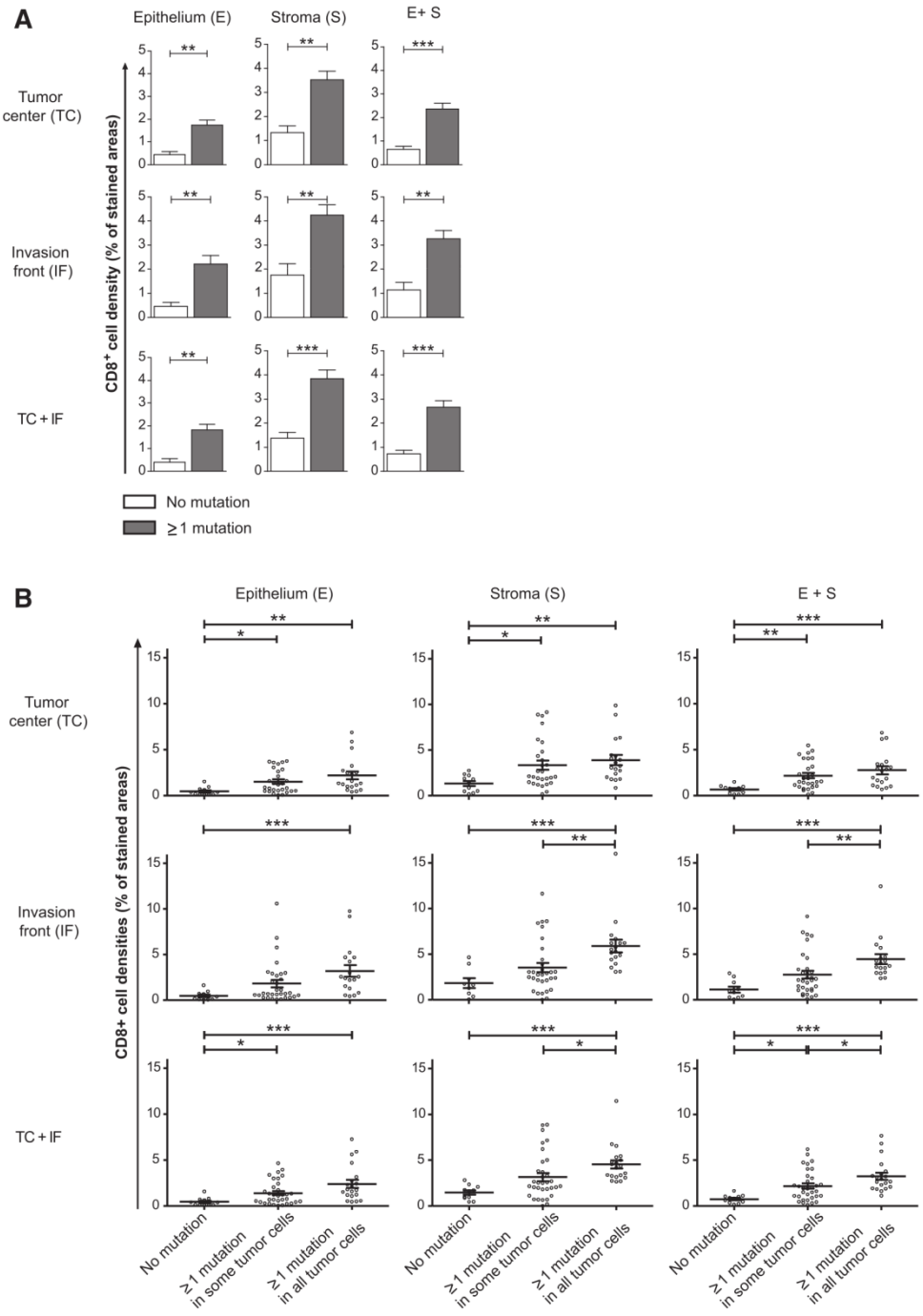


Figure 4.
Associations between *ASTE1*, *HNF1A*, and *TCF7L2* mutations and $CD8^+$ TIL densities. A, $CD8^+$ TIL density in tumors harboring no frameshift mutation or at least one frameshift mutation in *ASTE1*, *HNF1A*, or *TCF7L2* gene. Mean values are shown with SEM. Mann–Whitney tests were performed. B, $CD8^+$ TIL density in the tumors harboring no mutation, at least one mutation in some tumor cells only, and at least one mutation within all tumor cells in *ASTE1*, *HNF1A*, or *TCF7L2* gene. Bars, mean values; error bars, SEM. Pairwise comparisons were performed with a Kruskal–Wallis *post hoc* test. A and B, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.001$.

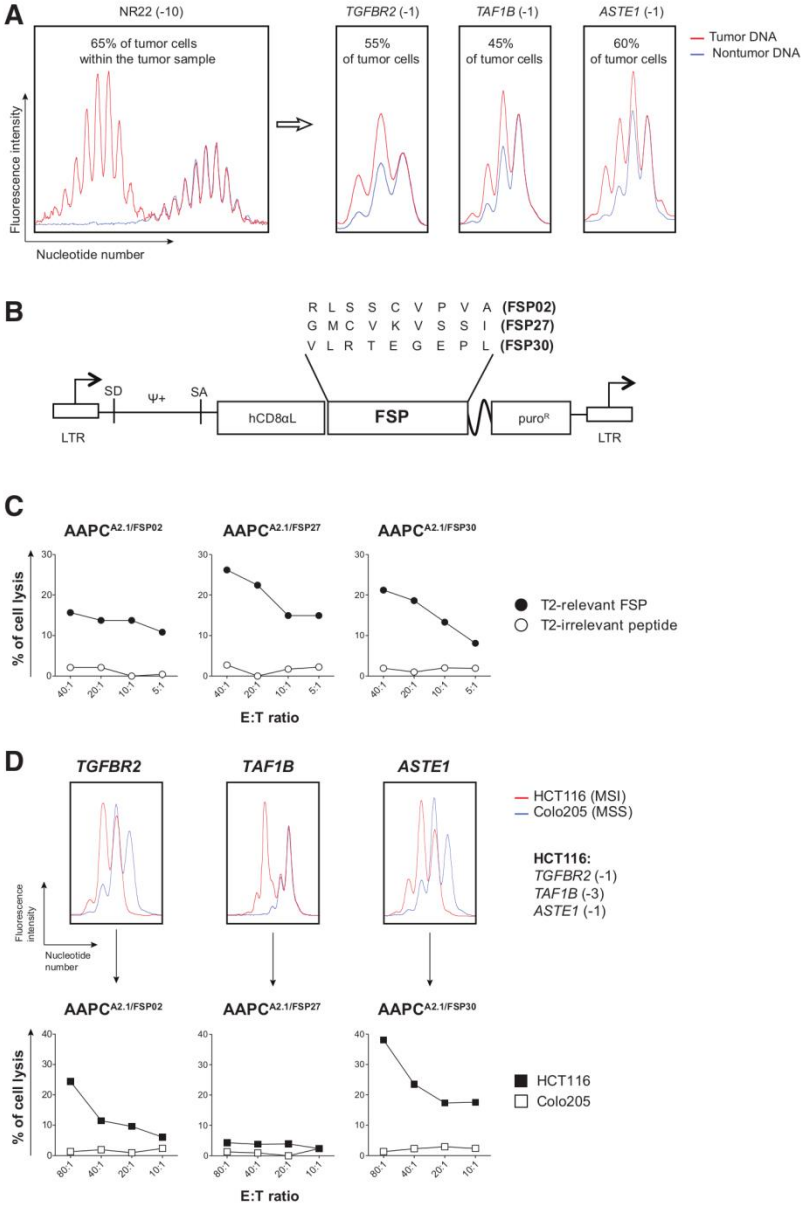


Figure 5.
In vitro activation of antitumor FSP-specific T cells from an MSI colorectal cancer patient. A, percentage of tumor cells within patient 1's tumor sample was evaluated on the PCR profile of the most unstable MSI marker, NR22. Mutations in target genes were detected in two multiplex PCRs. Three frameshift mutations, potentially leading to the synthesis of FSPs, were present in more than a third of all tumor cells: *TGFBR2* (−1), *TAF1B* (−1), and *ASTE1* (−1). B, construction of AAPCs expressing FSP02, FSP27, or FSP30 (AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/FSP27}$, and AAPC$^{A2.1/FSP30}$). Nonreplicative dicistronic gamma retroviral vector encoding FSP02, FSP27, or FSP30 and a puromycin-resistance element (puro^R, puromycin-*N*-acetyltransferase) in two coding sequences separated by an internal ribosome entry site was used. LTR, long terminal repeat; hCD8αL, human CD8α leader; SD, splice donor site; SA, splice acceptor site; ψ$^+$, extended packaging signal. C, specific cytotoxic activity of patient 1's peripheral TLs stimulated with AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/FSP27}$, or AAPC$^{A2.1/FSP30}$ was assessed in standard ^{51}Cr release assays on HLA-A*0201$^+$ T2 cells pulsed with an irrelevant or a relevant (FSP02, FSP27, or FSP30) peptide at different effector-to-target (E:T) ratios. D, top, for both HLA-A*0201$^+$ colorectal cancer cell lines, HCT116 (MSI) and Colo205 (MSS), *TGFBR2*, *TAF1B*, and *ASTE1*, multiplex PCR profiles are shown. HCT116 cells harbored *TGFBR2* (−1/−1), *TAF1B* (−3/wt), and *ASTE1* (−1/−1) mutations; bottom, specific cytotoxic activity of patient 1's peripheral TLs stimulated with AAPC$^{A2.1/FSP02}$, AAPC$^{A2.1/FSP27}$, or AAPC$^{A2.1/FSP30}$ was assessed in standard ^{51}Cr release assays on HCT116 and Colo205 cell lines, at different effector-to-target ratios.

TMA reliability having often been questioned, because of the small tissue areas studied in very heterogeneous tumors (27), we first validated our TMA-based techniques by confirming the concordance of TIL density analysis results obtained after both TMA and whole slide staining.

In our main series, we found that total TIL density was significantly higher within the tumors harboring a higher number of frameshift mutations or a mutation in *ASTE1* confirming the results previously obtained in 52 of these patients (16). Surprisingly, we did not confirm the association between *PTEN* (exon7) mutation and an increased CD3$^+$ tumor infiltration, pointing out how cautious we need to be when interpreting results found on different analyzed tumor areas, with different techniques.

Treg density did not change within tumors harboring a high number of frameshift mutations or within tumors harboring particular mutations. Noteworthy, *TGFBR2* frameshift mutation was not associated with FOXP3$^+$ (neither CD3$^+$ nor CD8$^+$) TIL density. This finding does not support the notion that the increased concentration of TGFβ in the tumor microenvironment, due to *TGRβR2* mutation, could lead to the differentiation of

effector TILs into regulatory FOXP3$^+$ TILs (28) and to a general increase in TIL density (29, 30). The fact that FOXP3$^+$ TIL density was not correlated with frameshift mutations could be due to a lack of FSP-specific infiltrating Tregs able to inhibit FSP-specific CD8$^+$ cytotoxic response, as suggested by Bauer and colleagues (31).

The most important result of this study was certainly the correlation found between CD8$^+$ TIL density and frameshift mutation number, in MSI colorectal cancer. Proteins derived from these mutations could be degraded into immunogenic peptides responsible for the increased CD8$^+$ TIL density. In line with this, *in vitro* CD8$^+$ TL responses against FSPs have already been reported in MSI colorectal cancer patients, although no correlation could be found between these responses and the frameshift mutations present in the tumors (15, 32).

We observed that frameshift mutations in *ASTE1*, *HNF1A*, and *TCF7L2* genes were robustly associated with an increased CD8$^+$ TIL density. Mutated *TCF7L2* mRNA expression, in MSI colorectal cancers, had already been found correlated with a stronger peritumoral lymphoid reaction (33) and with CD3$^+$ infiltration (34), but we showed for the first time, to our knowledge, a correlation of these three mutated genes with an increased CD8$^+$ tumoral infiltration. Moreover, CD8$^+$ TIL densities were higher in tumors harboring *ASTE1*, *HNF1A*, or *TCF7L2* mutation in all tumor cells. These correlations suggest that frameshift mutations in these genes can lead to the production of neoantigens fragmented into particularly immunogenic neopeptides, recognized by specific CD8$^+$ TILs.

It could be argued that some FSPs could not be presented because frameshift mutations generally give rise to premature termination codon-containing mRNAs, which are prone to degradation by nonsense-mediated mRNA decay (NMD; ref. 35). Among the three mutations we found to be robustly correlated with CD8$^+$ infiltration, *ASTE1* and *TCF7L2* mRNAs are not predicted to be degraded by NMD but *HNF1A* mRNA is. However, NMD is not a completely efficient mechanism in tumor cells (36, 37) and, moreover, it has been shown that a major source of antigenic peptides for the MHC-I pathway is the pioneer round of mRNA translation that precedes putative NMD (38).

CD8$^+$ TIL density was not correlated with prognosis in these independent series of patients with MSI colorectal cancer (20). Our series might be too small for robust survival statistical analysis, but there could also be a balance between beneficial effects of the immune response and deleterious effects of some studied mutations, many of the studied genes being tumor suppressor genes. Moreover, the correlations found between CD8$^+$ cell density and frameshift mutation number and spectrum suggest that specific CD8$^+$ TLs could be retained at the tumor site, but more detailed TIL *in situ* function studies, especially of activity markers such as granzymes, perforines, or cytokines, would be needed to better understand the relationships between these mutations and the immune cells.

After specific activation with AAPCs, MSI colorectal cancer patients' peripheral TLs could recognize FSPs derived from frameshift mutations present in their tumor, especially the most correlated one with CD8$^+$ TIL density, that is, *ASTE1* (−1) mutation, and the most studied one in terms of immunogenicity, that is, *TGFBR2* (−1) mutation (22). On the contrary, peripheral TLs from colorectal cancer patients whose tumors did not harbor these mutations or from healthy donors could not be activated with AAPCs encoding the same FSPs. This strongly suggests that, *in vivo*, the patient's TLs had already encountered these FSPs, expressed by the patient's tumor cells, allowing an *in vitro* memory specific recall response against the same antigen.

Altogether, this work establishes the link between frameshift mutations and CD8$^+$ TL tumor infiltration in MSI colorectal cancer patients, and emphasizes the interest, in MSI colorectal cancer patients and especially in young Lynch syndrome patients, of developing personalized cellular adoptive immunotherapy strategies based on *in vitro* stimulation of their own CTLs against tumor-specific immunogenic neopeptides derived from frameshift mutations found in their tumor.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

J. Galon is a cofounder and consultant at HalioDx. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: P. Maby, D. Tougeron, J.-B. Latouche
Development of methodology: P. Maby, D. Tougeron, E. Fauquembergue, A. Drouet, F. Le Pessot, R. Sesboüé, T. Frébourg, J.-B. Latouche
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): P. Maby, D. Tougeron, M. Hamieh, H. Kora, A. Drouet, J. Leprince, J. Mauillon, F. Le Pessot, R. Sesboüé, J.-J. Tuech, J.-C. Sabourin, P. Michel, T. Frébourg, J.-B. Latouche
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): P. Maby, D. Tougeron, B. Mlecnik, H. Kora, G. Bindea, H.K. Angell, N. Elie, J. Benichou, F. Le Pessot, J.-J. Tuech, J.-B. Latouche
Writing, review, and/or revision of the manuscript: P. Maby, D. Tougeron, H.K. Angell, J. Benichou, J.-J. Tuech, J. Galon, J.-B. Latouche
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): D. Tougeron, M. Hamieh, T. Fredriksen, A. Drouet, J. Mauillon, F. Le Pessot, R. Sesboüé, T. Frébourg, J.-B. Latouche
Study supervision: D. Tougeron, J. Galon, J.-B. Latouche

Grant Support

Inserm, Haute-Normandie Region and La Ligue Contre le Cancer de Haute-Normandie provided P. Maby's Ph.D. fellowship and financial support for the research project.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received October 15, 2014; revised May 11, 2015; accepted May 14, 2015; published OnlineFirst June 9, 2015.

References

1. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 2006;313:1960–4.
2. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. J Clin Oncol 2011;29:610–8.
3. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. Immunity 2013;39:782–95.
4. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. Immunity 2013;39:11–26.

5. Söreide K, Janssen EAM, Söiland H, Körner H, Baak JPA. Microsatellite instability in colorectal cancer. Br J Surg 2006;93:395–406.
6. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. N Engl J Med 2000;342:69–77.
7. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 1993;363:558–61.
8. Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. Br J Surg 2000; 87:1197–202.
9. Le Gouvello S, Bastuji-Garin S, Aloulou N, Mansour H, Chaumette M-T, Berrehar F, et al. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. Gut 2008;57:772–9.
10. Guidoboni M, Gafà R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, et al. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. Am J Pathol 2001;159:297–304.
11. Phillips SM, Banerjea A, Feakins R, Li SR, Bustin SA, Dorudi S. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. Br J Surg 2004;91:469–75.
12. Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. BMC Immunol 2010;11:19.
13. Takemoto N, Konishi F, Yamashita K, Kojima M, Furukawa T, Miyakura Y, 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 2004;34: 90–8.
14. Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, Sutter C, Ridder R, Bork P, et al. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. Int J Cancer 2001;93:12–9.
15. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. Gastroenterology 2008; 134:988–97.
16. Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A, Le Pessot F, Sesboüé R, Laurent M, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. Mod Pathol 2009;22:1186–95.
17. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. Gastroenterology 2002;123:1804–11.
18. Trautmann K, Terdiman JP, French AJ, Roydasgupta R, Sein N, Kakar S, et al. Chromosomal instability in microsatellite-unstable and stable colon cancer. Clin Cancer Res 2006;12:6379–85.
19. Jorissen RN, Lipton L, Gibbs P, Chapman M, Desai J, Jones IT, et al. DNA copy-number alterations underlie gene expression differences between microsatellite stable and unstable colorectal cancers. Clin Cancer Res 2008;14:8061–9.
20. Tougeron D, Maby P, Elie N, Fauquembergue E, Le Pessot F, Cornic M, et al. Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers. PLoS ONE 2013;8: e61001.
21. Latouche JB, Sadelain M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. Nat Biotechnol 2000;18:405–9.
22. Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, et al. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. Int J Cancer J Int Cancer 2001;93:6–11.
23. 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 2004;4:14–23.
24. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics 1999;50:213–9.
25. Fauquembergue E, Toutirais O, Tougeron D, Drouet A, Le Gallo M, Desille M, et al. HLA-A*0201-restricted CEA-derived peptide CAP1 is not a suitable target for T-cell-based immunotherapy. J Immunother 2010;33:402–13.
26. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Br J Cancer 2014;110:1595–605.
27. Barnetson R, Jass J, Tse R, Eckstein R, Robinson B, Schnitzler M. Mutations associated with microsatellite unstable colorectal carcinomas exhibit widespread intratumoral heterogeneity. Genes Chromosomes Cancer 2000; 29:130–6.
28. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4$^+$CD25$^-$ T cells into CD4$^+$CD25$^+$ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. J Immunol 2007;178: 2883–92.
29. Baker K, Zlobec I, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR, Lugli A. Differential significance of tumor infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway. Eur J Cancer 2007;43:624–31.
30. Quinn E, Hawkins N, Yip YL, Suter C, Ward R. CD103$^+$ intraepithelial lymphocytes–a unique population in microsatellite unstable sporadic colorectal cancer. Eur J Cancer 2003;39:469–75.
31. Bauer K, Nelius N, Reuschenbach M, Koch M, Weitz J, Steinert G, et al. T cell responses against microsatellite instability-induced frameshift peptides and influence of regulatory T cells in colorectal cancer. Cancer Immunol Immunother 2013;62:27–37.
32. Saeterdal I, Bjørheim J, Lislerud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, et al. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:13255–60.
33. Kim H, Kim WK, Park M, Park M, Kim YJ, Shin N, et al. Identification and selective degradation of neopeptide-containing truncated mutant proteins in the tumors with high microsatellite instability. Clin Cancer Res 2013;19:3369–82.
34. El-Bchiri J, Guilloux A, Dartigues P, Loire E, Mercier D, Buhard O, et al. Nonsense-mediated mRNA decay impacts MSI-driven carcinogenesis and anti-tumor immunity in colorectal cancers. PLoS ONE 2008;3:e2583.
35. Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. Trends Biochem Sci 1998;23:198–9.
36. El-Bchiri J, Buhard O, Penard-Lacronique V, Thomas G, Hamelin R, Duval A. Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers. Hum Mol Genet 2005;14:2435–42.
37. Wang D, Zavadil J, Martin L, Parisi F, Friedman E, Levy D, et al. Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by the tumor microenvironment promotes tumorigenesis. Mol Cell Biol 2011;31:3670–80.
38. Apcher S, Daskalogianni C, Lejeune F, Manoury B, Imhoos G, Heslop L, et al. Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:11572–7.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Frameshift mutations within target genes in microsatellite unstable colorectal cancers. Frequency of mutations and proportion of tumors with mutations in all malignant cells are given for two independent series and for all patients (n=87, n=35 and n=122).

Supplementary Table 2. Number of frameshift mutations according to several clinical characteristics.

Number of frameshift mutations are given for two independent series and for all patients (n=87, n=35 and n=122). *P* values are given in bold; n, number of patients; ns, not significant; *, for the smaller second series, no significant association between number of frameshift mutations and clinical characteristics could be found.

Supplementary Figure 1. Correlation between $CD3^+$ tumor-infiltrating lymphocyte densities calculated from whole slides and from TMA samples.

For the 52 tumors included in our previous study (16), X axis gives the percentage of anti-CD3 antibody-stained areas calculated from six representative fields from whole slides, for each tumor. For the same tumors, Y axis gives the percentage of anti-CD3 antibody-stained areas calculated from tissue micro array (TMA) samples (Spearman test).

Supplementary Figure 2. Associations between frameshift mutations and $CD8^+$ TIL densities for the second series.

(A) Associations between frameshift mutation percentage and $CD8^+$ TIL density. For 35 patients, X axis gives the percentage of mutations found within the 22 studied coding repeat sequences and Y axis gives the density of $CD8^+$ immunostained cells (Spearman test).

(B) $CD8^+$ TIL density in the invasion front of tumors harboring no frameshift mutation or at least one frameshift mutation in the *HNF1A* or *TCF7L2* gene. Mean values are shown with SEM. Mann-Withney test was performed. (C) $CD8^+$ TIL density in the invasion front of the tumors harboring no mutation, at least one mutation in some tumor cells only and at least one mutation within all tumor cells, in the *HNF1A* or *TCF7L2* gene. Bars indicate the mean values ± SEM. Pairwise comparisons were performed with a Kruskal-Wallis post-hoc test. (B and C) *, $P < .05$.

Supplementary Figure 3. *In vitro* cytotoxic activity of peripheral TLs from donors harboring or not mutations in *TGFBR2*, *TAF1B* and *ASTE1* genes.

(A) Peripheral TLs from an HLA-A*02^+ MSI Lynch patient, with a tumor harboring the (-1) *TGFBR2* and (-1) *TAF1B* mutations, were stimulated with $AAPC^{A2.1/FSP02}$, $AAPC^{A2.1/FSP27}$ or $AAPC^{A2.1/FSP30}$. Specific cytotoxic activity of these TLs was assessed in standard ^{51}Cr release assays at different effector to target (E:T) ratios. Upper panel: assays performed on HLA-A*0201^+ T2 cells pulsed with an irrelevant or a relevant (FSP02, FSP27 or FSP30) peptide. Lower panel: assays performed on HLA-A*0201^+ HCT116 (MSI) and Colo205 (MSS) colorectal cancer cell lines.

(B) Specific cytotoxic activity of peripheral TLs stimulated with $AAPC^{A2.1/FSP02}$, $AAPC^{A2.1/FSP27}$, $AAPC^{A2.1/FSP30}$ or $AAPC^{A2.1/M1m}$ was assessed in standard ^{51}Cr release assays at different effector to target (E:T) ratios. Assays were performed with peripheral TLs from

two HLA-A*02^{+} patients with tumors in which no mutation in *TGFBR2*, *TAF1B* or *ASTE1* gene was detected (an MSI Lynch patient, upper panel, and an MSS patient, middle panel) and with peripheral TLs from two HLA-A*02^{+} healthy donors (representative results are shown in the lower panel).

/		First series (n=87)		Second series (n=35)		Total (n=122)	
Genes	Repeat	Percentage of tumours with mutations	Percentage of mutated samples with mutations in all malignant cells	Percentage of tumours with mutations	Percentage of mutated samples with mutations in all malignant cells	Percentage of tumours with mutations	Percentage of mutated samples with mutations in all malignant cells
ACVR2	(A)8	90.6 % (77/85)	34.2 % (26/76)	97.1 % (33/34)	37.5 % (12/32)	92 %	35 %
TAF1B	(A)11	84.9 % (73/86)	1.4 % (1/72)	82.4 % (28/34)	0.0 % (0/27)	84 %	1 %
ASTE1	(A)11	76.6 % (63/82)	34.9 % (22/63)	93.8 % (30/32)	26.7 % (8/30)	82 %	32 %
TGFBR2	(A)10	78.8 % (67/85)	36.4 % (24/66)	78.1 % (25/32)	12.0 % (3/25)	79 %	30 %
SEC63	(A)9 and (A)10	68.7 % (57/83)	7.1 % (4/56)	78.8 % (26/33)	0.0 % (0/26)	72 %	5 %
CASP5	(A)10	67.9 % (57/84)	8.9 % (5/56)	68.8 % (22/32)	9.5 % (2/21)	68 %	9 %
AIM2	(A)10	56.3 % (40/71)	20.5 % (8/39)	92.9 % (26/28)	15.4 % (4/26)	67 %	18 %
MSH3	(A)8	55.3 % (47/85)	10.9 % (5/46)	63.6 % (21/33)	0.0 % (0/21)	58 %	7 %
TCF7L2	(A)9	44.3 % (31/70)	10.0 % (3/30)	41.4 % (12/29)	8.3 % (1/12)	43 %	10 %
HNF1A	(A)8	41.9 % (31/74)	0.0 % (0/30)	44.8 % (13/29)	0.0 % (0/13)	43 %	0 %
OGT	(A)10	38.3 % (31/81)	6.7 % (2/30)	45.5 % (15/33)	6.7 % (1/15)	40 %	7 %
MBD4	(A)10	39.3 % (33/84)	6.2 % (2/32)	37.9 % (11/29)	18.2 % (2/11)	39 %	9 %
BAX	(G)8	31.0 % (22/71)	4.5 % (1/22)	54.8 % (17/31)	17.6 % (3/17)	38 %	10 %
PTEN	(A)6 exon 8 exon 7	41.5 % (34/82) 15.0 % (13/87)	3.1 % (1/32) 9.1 % (1/11)	25.0 % (8/32) 33.3 % (11/33)	12.5 % (1/8) 8.3 % (1/12)	37 % 20 %	5 % 9 %
IGFR2	(G)8	33.7 % (27/80)	7.4 % (2/27)	41.2 % (14/34)	7.1 % (1/14)	36 %	7 %
RAD50	(A)9	29.1 % (23/79)	9.1 % (2/22)	51.6 % (16/31)	6.3 % (1/16)	35 %	8 %
PRDM2	(A)8 (A)9	34.3 % (23/67) 16.7 % (13/78)	4.5 % (1/22) 0.0 % (0/12)	34.4 % (11/32) 39.3 % (11/28)	0.0 % (0/10) 9.1 % (1/11)	34 % 23 %	3 % 4 %
MSH6	(C)8	25.3 % (21/83)	0.0 % (0/21)	28.1 % (9/32)	0.0 % (0/8)	26 %	0 %
APC	(A)7	24.0 % (18/75)	5.9 % (1/17)	10.3 % (3/29)	33.3 % (1/3)	20 %	10 %

Table 1

	First series (n=87)	Second series (n=35)*	Total (n=122)
Age	**.027**		**.008**
< 60 years	7.8	8.8	8.3
≥ 60 years	9.9	10.8	10.2
TNM stage	**ns**		**ns**
I	5.1	11.0	6.5
II	9.8	9.9	9.9
III	10.0	11.1	10.2
IV	10.0	9.2	9.5
Wall invasion	**.006**		**.012**
T1 or 2	5.1	11.0	6.5
T3 or 4	9.9	10.2	10.0
Node invasion	**ns**		**ns**
N0	9.2	10.1	9.4
N+	9.8	10.4	10.0
Tumor diameter	**.002**		**.005**
< 6 cm	7.1	9.7	8.3
≥ 6 cm	10.4	10.8	10.5
Histological grade	**.009**		**.047**
Well differentiated	8.4	10.3	9.1
Moderately differentiated	10.9	9.9	10.6
Poorly differentiated	12.1	10.8	11.8
Tumoral recurrence	**ns**		**ns**
No	9.2	10.4	9.6
Yes	9.4	9.6	9.5
VELIPI criteria	**.011**		**.028**
No	8.4	10.0	9.0
Yes	10.7	10.6	10.8

Table 2

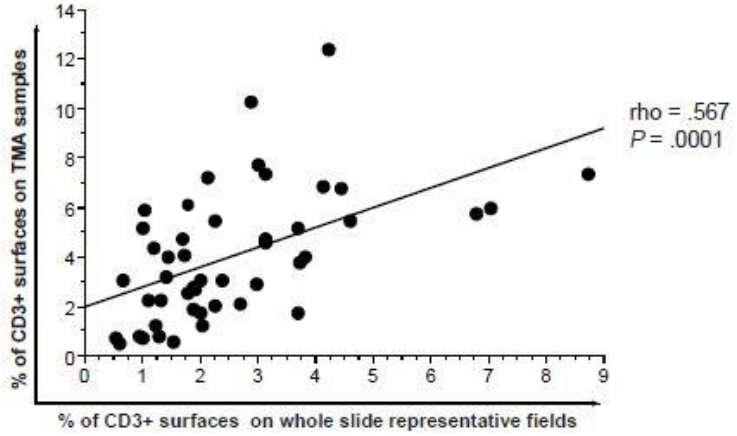


Figure 1

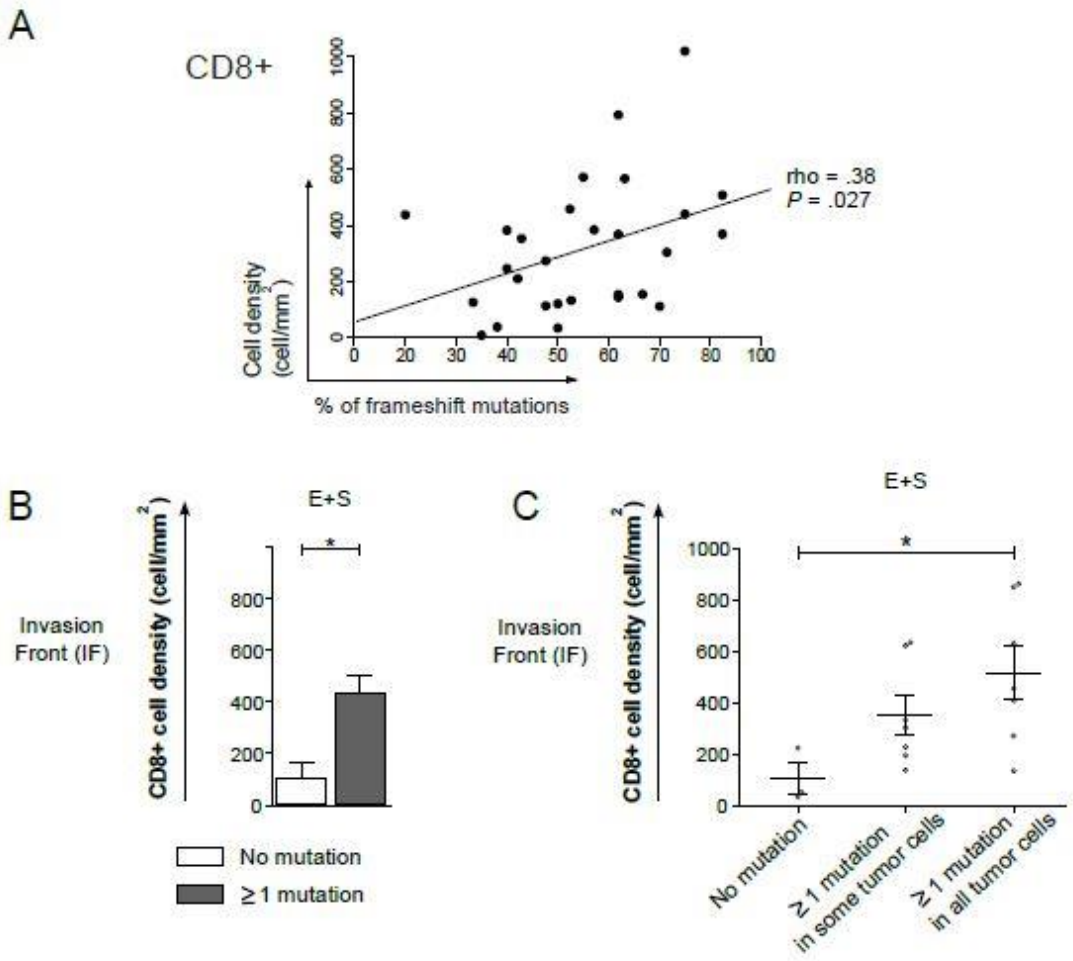

A
CD8+
rho = .38
P = .027
Cell density (cell/mm2)
% of frameshift mutations
B
E+S
CD8+ cell density (cell/mm2)
Invasion Front (IF)
No mutation
≥1 mutation
C
E+S
CD8+ cell density (cell/mm2)
Invasion Front (IF)
No mutation
≥1 mutation in some tumor cells
≥1 mutation in all tumor cells

Figure 2

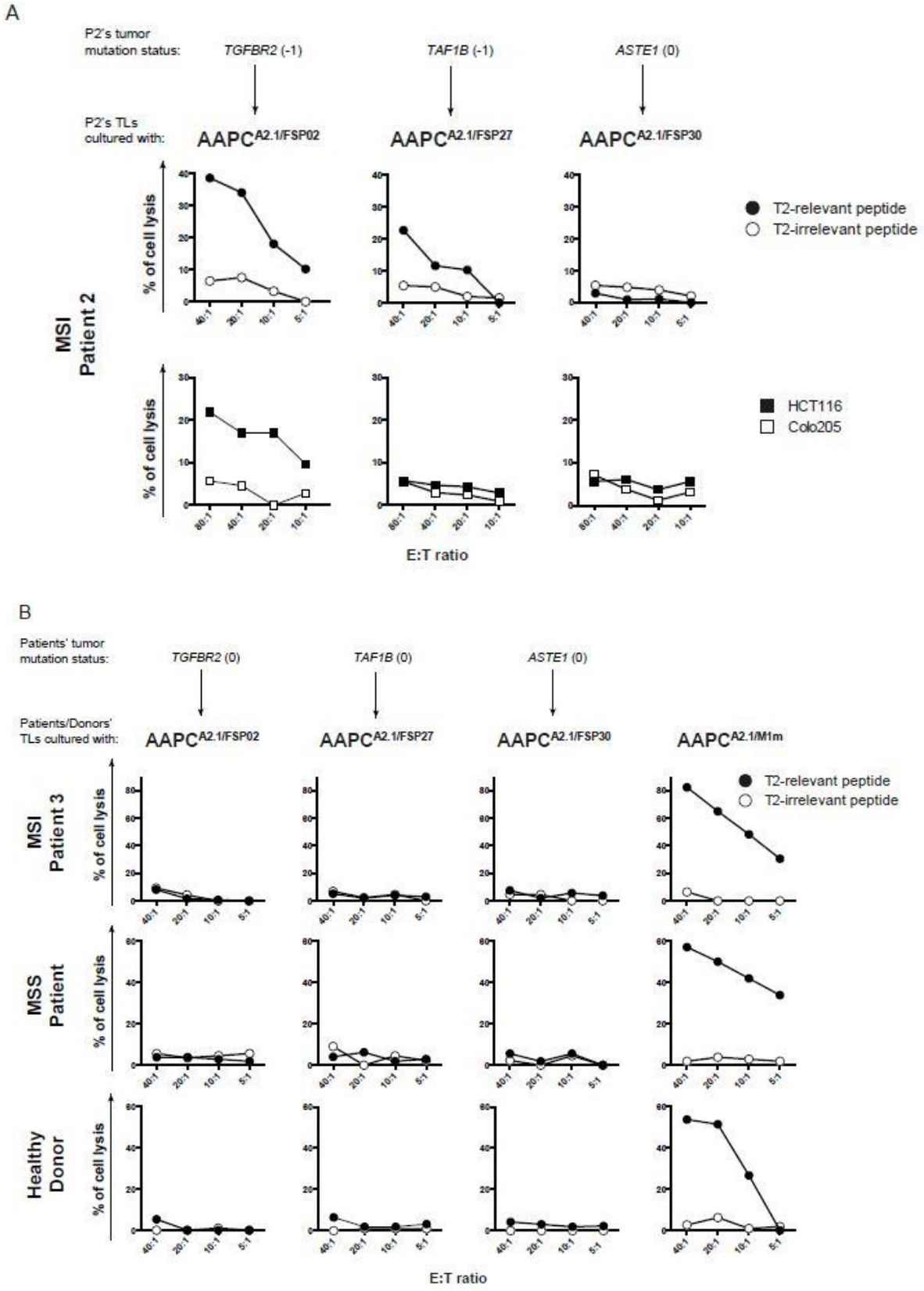

A
P2's tumor mutation status:
TGFBR2 (-1)
TAF1B (-1)
ASTE1 (0)
P2's TLs cultured with:
AAPC A2.1/FSP02
AAPC A2.1/FSP27
AAPC A2.1/FSP30
MSI Patient 2
% of cell lysis
T2-relevant peptide
T2-irrelevant peptide
HCT116
Colo205
E:T ratio
B
Patients' tumor mutation status:
TGFBR2 (0)
TAF1B (0)
ASTE1 (0)
Patients/Donors' TLs cultured with:
AAPC A2.1/FSP02
AAPC A2.1/FSP27
AAPC A2.1/FSP30
AAPC A2.1/M1m
MSI Patient 3
MSS Patient
Healthy Donor
% of cell lysis
T2-relevant peptide
T2-irrelevant peptide
E:T ratio

Figure 3

Annexe 2

Au cours de cette thèse, j'ai développé des compétences en culture et en transduction cellulaire, dont j'ai pu faire profiter l'unité Inserm U918 de Rouen, pour un projet développé dans le cadre des lymphomes. Cette collaboration a donné lieu à un article publié dans *Leukemia Research* et à un article soumis, présentés ci-dessous.

Leukemia Research 45 (2016) 90–100

Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres

HACE1 is a putative tumor suppressor gene in B-cell lymphomagenesis and is down-regulated by both deletion and epigenetic alterations

Abdelilah Bouzelfen[a,*], Marion Alcantara[a], Hafid Kora[b], Jean-Michel Picquenot[a], Philippe Bertrand[a], Marie Cornic[a], Sylvain Mareschal[a], Elodie Bohers[a], Catherine Maingonnat[a], Philippe Ruminy[a], Sahil Adriouch[c], Olivier Boyer[c], Sydney Dubois[a], Christian Bastard[a], Hervé Tilly[a], Jean-Baptiste Latouche[b], Fabrice Jardin[a]

[a] Henri Becquerel Center, INSERM U918, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (iRiB) Rouen, France
[b] INSERM U1079, Faculty of Medecine of Rouen, iRiB, France
[c] INSERM U905, Faculty of medecine of Rouen, iRiB, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 November 2015
Received in revised form 7 March 2016
Accepted 8 April 2016
Available online 11 April 2016

Keywords:
Tumor suppressor gene
Epigenetic
Lymphoma
HDAC inhibitors
Deletions

ABSTRACT

HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1, *HACE1*, located on chromosome 6q, encodes an E3 ubiquitin ligase and is downregulated in many human tumors. Here, we report *HACE1* as a candidate tumor suppressor gene down-regulated by a combination of deletion and epigenetic mechanisms. *HACE1* deletions were observed in 40% of B-cell lymphoma tumors. Hypermethylation of the *HACE1* promoter CpG177 island was found in 60% (68/111) of cases and in all tested B-cell lymphoma lines. Using HDAC inhibitors, we observed predominantly inactive chromatin conformation (methylated H3 histones H3K9me2) in *HACE1* gene promoter region. We demonstrated in Ramos and Raji cells that down-regulation of *HACE1* expression was associated with a significant decrease in apoptosis and an accumulation of cells in the S and G2/M phases. Our experiments indicate that *HACE1* can act as a haploinsufficient tumor suppressor gene in most B-cell lymphomas and can be downregulated by deacetylation of its promoter region chromatin, which makes *HACE1* a potential target for HDAC inhibitors.
© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Epigenetic alterations can lead to events that are functionally equivalent to mutations/deletions during lymphomagenesis, such as silencing key regulatory tumor suppressor genes [1]. The covalent modification of DNA and histones contributes to the establishment of local chromatin structure that influences the permissiveness of gene promoters for the subsequent assembly and/or activation of the transcriptional machinery [2]. A comprehensive study identified *HACE1* (located on chromosome 6q21) as a tumor suppressor gene involved in the spontaneous tumorigenesis of several cancers *in vivo*, including lymphoma [3]. The protein HACE1 belongs to the HECT family of ubiquitin ligases (HECT E3), which have intrinsic catalytic activity and specificity for substrates involved in the regulation of growth and apoptosis [4]. HACE1 inhibits the tumor suppressor gene RARb [5], ubiquitylates RAC1, which is a rho-GTPase involved in cell proliferation and G2/M cycle progression [6] and degrades cyclin D1 through the control of ROS [7].

A recent study showed that down-regulation of *HACE1* expression is associated with neuroblastoma progression and poor patient Overall Survival (OS) [8]. Furthermore, *HACE1* is down-regulated in Wilm's tumor patients, and this alteration is mediated through hypermethylation of the cytosine phosphate guanine (CpG) island 177 (CpG-177), which is located upstream of the transcription start site (TSS) [4]. Hypermethylation of CpG-177 in the *HACE1* promoter is frequently observed in colorectal and gastric carcinomas, and hypermethylation of *HACE1* is associated with the severity of clinicopathological findings, especially lymph node metastasis, in colorectal carcinomas [9–11]. Thus, *HACE1* was demonstrated to be a tumor suppressor gene in NK cell malignancies and to be down-regulated through a combination of deletion and cytosine phosphate guanine island hypermethylation [12]. Mutations in *HACE1* have not been found in the coding or promoter regions of any cancer studied to date. These observations are consistent with the hypothesis that *HACE1* functions as a tumor suppressor gene.

* Corresponding author.
E-mail address: bouzelfi.a@gmail.com (A. Bouzelfen).

http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2016.04.007
0145-2126/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

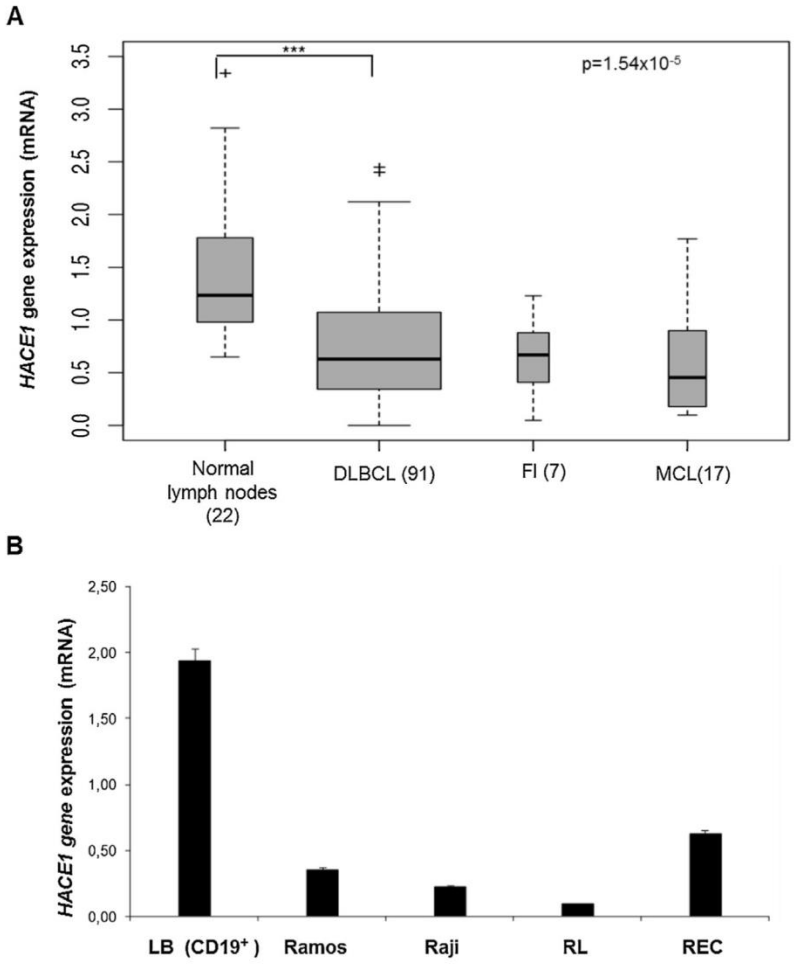


Fig. 1. Down-regulation of *HACE1* expression in B-lymphoma tumors and B-lymphoma cell lines. (A) *HACE1* expression by quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR) in cryopreserved B-lymphoma tumor cells from 125 patients (101 Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)), 17 Follicular lymphoma (FL), 10 Mantle cell lymphoma (MCL) and normal lymph nodes cells from 22 normal patients. Data are means of two experiments $^{***}P < 0.001$. (B) Quantification of *HACE1* mRNA in B-lymphoma cell lines and lymphocyte control cells from peripheral blood. The *HACE1* mRNA expression in cell lines was determined with qRT-PCR. B cells from normal blood donors isolated from peripheral blood mononuclear cells were used as control. Data are means ± SDs of three experiments.

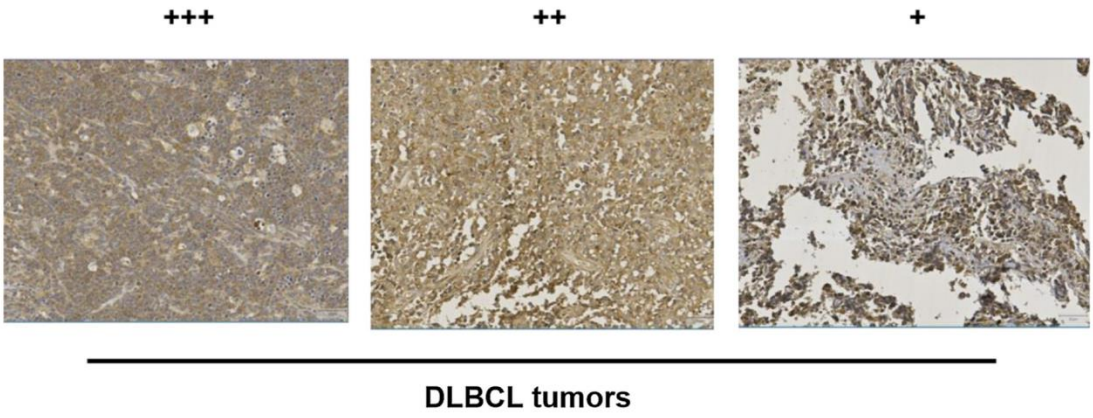


Fig. 2. Representative HACE1 staining in paraffin-embedded tissues from DLBCL tumors (magnification x200) Samples were scored according to staining intensity as + (low), ++ (intermediate) and +++ (high).

However the function of *HACE1* and the factors involved in its transcriptional regulation are largely unknown in the context of B-cell lymphomas, such as diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), mantle cell lymphoma (MCL) or Burkitt lymphoma. Thus, therapeutic challenges persist, and the development of new targeted strategies is needed to improve the outcomes for these types of pathology [14].

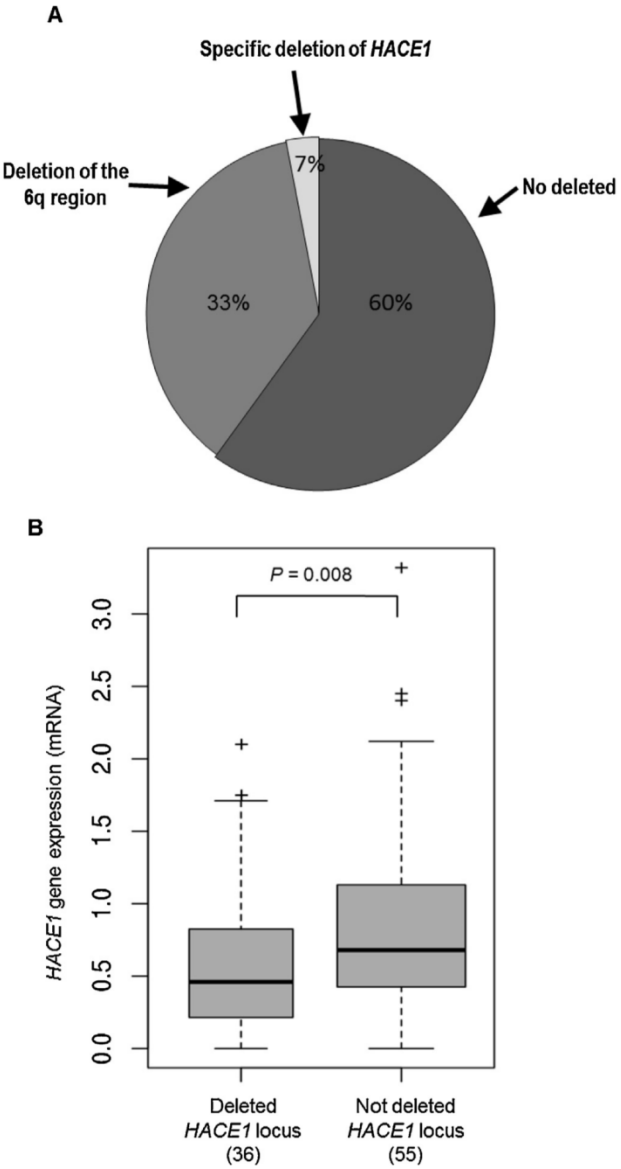


Fig. 3. Deletion of *HACE1* locus localized in the 6q16 region in DLBCL. (A) The graphic represents deletion of the 16q16 region in 91 DLBCL samples. Deletion status was determined by QMPSF analysis. (B) Quantitative analysis of *HACE1* mRNA levels in deleted and intact *HACE1* loci. Differences between groups were determined using the Mann-Whitney test (p value = 0.008). $^{**}P < 0.01$.

The investigations of these studies consisted on whether *HACE1* was down-regulated in B-cell lymphoma and to understand the central role of various genetic and epigenetic mechanism including deletions and chromatin modifications on *HACE1* down-regulation. We also demonstrated a putative tumor suppressive role for *HACE1* in B cell malignancies using functional assays.

2. Material and methods

2.1. Patients

A total of 125 patients receiving treatment at our institution and who were diagnosed with *de novo* DLBCL (n = 101), MCL (n = 17) or follicular lymphoma (FL) (n = 7) between 1987 and 2010 were included in our study (Table 1 Supplementary materials). Tumors were classified according to the World Health Organization (WHO) classification scheme. Tumor DNA and RNA were extracted at the time of diagnosis from fresh or frozen tissue by conventional protocols. Patients were recruited with the approval of the institutional review board, and informed consent was obtained according to the Declaration of Helsinki. The name of the ethics committee/institutional review board(s) that approved our study is IRB and the approval number is 1501B.

2.2. Cell lines and culture conditions

The following four B-cell lymphoma cell lines obtained from the ATCC were analyzed: Ramos (Burkitt lymphoma), RL (DLBCL), Raji (Burkitt lymphoma) and REC (MCL). All cell lines were maintained in RPMI1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin, and 2 mmol/L glutamine. Cells were grown and maintained at 37 °C in a 5% CO_2

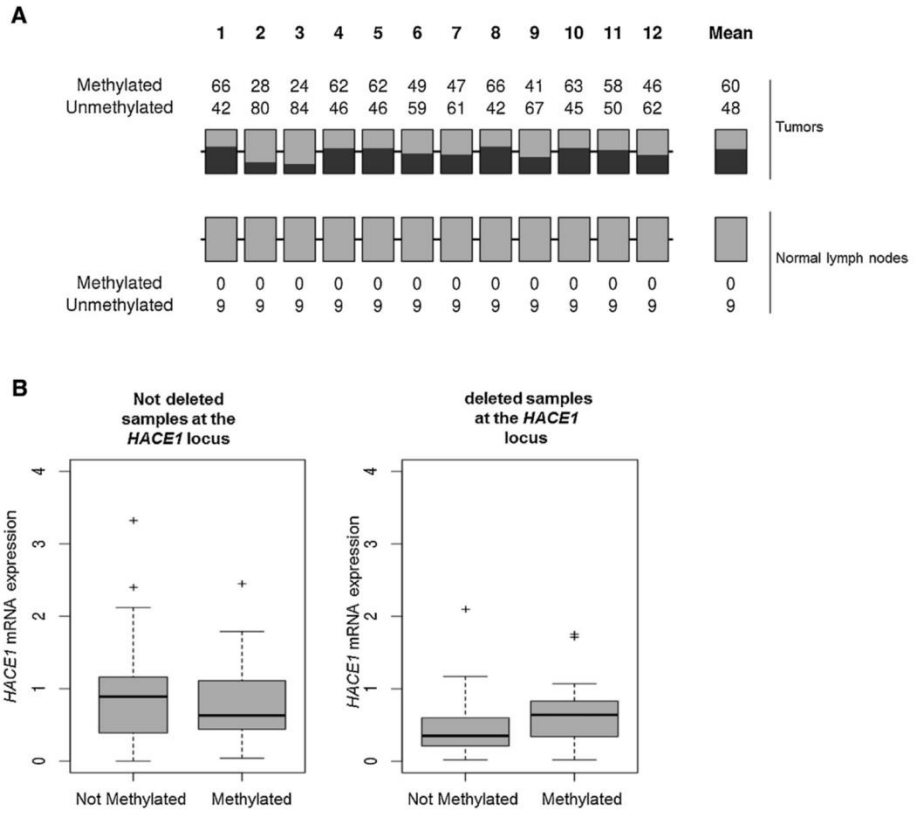


Fig. 4. Hypermethylation of *HACE1* promoter at the CpG-177 island in B-cell lymphoma. (A) Each box corresponds to a CG position in the CpG 177 island. Colored bars represent the aggregated methylation status determined by pyrosequencing at each position (black, methylated and grey, unmethylated). Numbers above or below each bar indicate the total number of methylated and unmethylated samples at each CG position. (B) Quantification of *HACE1* mRNA expression levels in B-cell lymphoma tumors according to methylation status. The results from the Mann-Whitney test were not significant.

Table 1
Clinical data of patients.

Age	
	<65 years 50 (46.3%)
	>65 years 48 (44.4%)
	Not available10 (9.3%)
Gender	
	Male 55 (51%)
	Female 53 (49%)
Subtype	
	GCB 26 (24%)
	ABC 33 (30.5%)
	Undetermined 16 (15%)
	Not available 33 (30.5%)
Age-adjusted IPI score	
	0–1 36 (33.3%)
	2–3 61 (56.5%)
	Not available 11 (10.2%)
Stage	
	I-II 29 (26.8%)
	III-IV 69 (63.9%)
	Not available 10 (9.3%)
Rituximab containing regimen	
	Yes 61 (56.5%)
	No 37 (34.2%)
	Not available 10 (9.3%)

humidified atmosphere. Ramos, Raji and RL cells were treated with 5-Azacitidine-dC (5-Aza-dC, Sigma, final conc. 2, 5 and 7 μM for Ramos, Raji and RL cells, respectively) for 5 days and with Trichostatin A (TsA, Sigma, final conc. 100 nM) for 24 h. For staurosporine treatment, Ramos and Raji cells were cultured in media containing 10 μM of staurosporine (Sigma) for 3 h.

2.3. Normal B-cell isolation

Fresh blood from healthy donors (HDs) was collected by the Etablissement Français du Sang. Mononuclear cells isolated from peripheral blood were prepared by Ficoll gradient centrifugation, and B cells were isolated by negative selection with the Dynabeads untouched B-cell kit (Dynal Life Technologies) (Fig. 1 Supplementary data).

2.4. Quantitative real-time PCR (QRT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and 1 μg of RNA was converted into cDNA in a random-primer synthesis reaction with the M-MLV reverse transcriptase kit (Life Technologies). All primer/probe sets were designed to span exon boundaries to eliminate contaminating signal from genomic DNA. The *HACE1* gene-specific primer/probe set (forward: AGTTATTCAGTGGTTCT, probe: [6FAM]CGGGCAGTTCCAGGGTCCCAC [TAMRA], reverse: ACTTCCACCCATGATATTAGCAAAC) was multiplexed with the VIC-MGB-labeled TBP endogenous control primer/probe kit (Applied Biosystems). PCR was carried out with a TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems) under standard conditions. An ABI 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) was used to run the PCRs and measure fluorescence at each cycle. Each PCR reaction was performed in triplicate and each sample was analyzed independently at least twice. A total of 101 DLBCL, 7 FL, 17 MCL samples and 22 normal lymph nodes were analyzed by QRT-PCR.

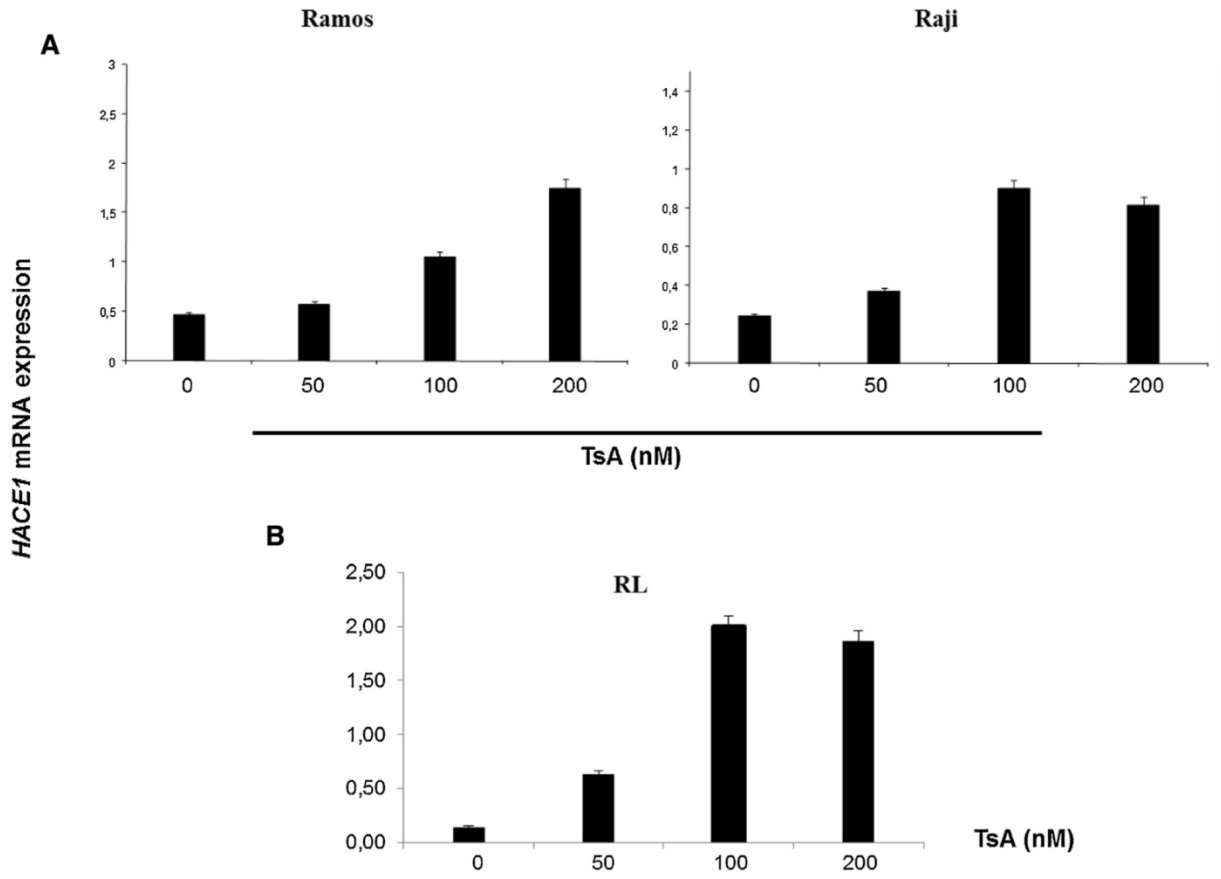


Fig. 5. Effect of Trichostatin A (TsA) on *HACE1* re-expression in B-cell lymphoma cell lines. Ramos, RL and Raji cells were treated with various concentrations (x-axis) of TSA as indicated for 24 h.

2.5. Immunohistochemistry for HACE1 expression

For each tumor, four-micrometer thick paraffin sections were deparaffinized, and endogenous activity was quenched by incubation of sections in 3% hydrogen peroxide and absolute methanol. Sections from FFPE tissue samples were used to build Tissue Microarrays (TMAs).The FFPE slides were subjected to heat-induced antigen retrieval pH6 on PTlink (DAKO). For HACE1 antibody (1/100, Abcam), immunochemistry was performed with Vectastain ABC Rabbit IgG kit (Vector). The expression of HACE1 was assessed semi-quantitatively as follows: +(low), ++ (intermediate), and +++ (high). Each tumor was represented 3 times on the TMAs. Slides were scored in a blinded fashion by an experienced anatomopathologist (JMP).

2.6. Gene copy number abnormalities

A quantitative multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments (QMPSF) assay was used to detect *HACE1* deletions. QMPSF is a method used to detect genomic deletions or duplications of short genomic fragments (patent FR02099247) [17] and has been previously used in studies of gene copy number analysis of lymphoma patients [18,19]. Short genomic fragments (between 90 and 310 bp) located in *HACE1* and in genes located within 6q region (*GRIK2, TNFAIP3, IFNGR1, LIN28B,* and *PERP*) were simultaneously amplified by PCR in a single reaction with dye-labeled primers. An additional fragment corresponding to exon 7 of the *CECR1* gene, located on chromosome 22q, was co-amplified as a control. Primer sequences and the location and length of the fragments are shown in Table 2 in Supplementary material. A total of 2 μL of the PCR product was resuspended in a mix containing 19.75 μL deionized formamide and 0.25 μL GeneScan 600 LIZ size standard (Applied Biosystems). PCR products were run on an ABI PRISM sequencer, and data were analyzed with Peak Scanner v.1.0 software (Applied Biosystems). In this analysis, the peak height of each patient sample was compared with the mean peak height of samples from healthy controls. The copy number of each tested fragment was expressed as the following ratio: (peak height of the tested fragment for the patient/peak height of *CECR1* for the patient)/(mean peak height of the tested fragment for controls/mean peak height of *CECR1* for the controls). Ratios < 0.75 were indicative of deletion. Positive results were confirmed in a second independent QMPSF assay. Primers were designed by Prestagen (Bois-Guillaume, France).

2.7. Methylation analysis

The methylation status of CpG pairs 1–12 in the *HACE1* gene was analyzed by pyrosequencing. Genomic DNA (500 ng) was bisulphite-converted with the EZ DNA Methylation Gold kit (Zymo Research Corporation) according to the manufacturer's protocol. PCR was performed to amplify the region of interest. Primers were designed with Primer 3. Cycling conditions were as follows: 95 °C for 15 min; 45 cycles of 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s; and 72 °C for 5 min. Internal and sequencing primers were designed using the PyroMark software (Qiagen). Primer sequences are provided in Supplementary materials Table 3. The PCR control DNA set (Qiagen S.A) containing unmethylated and methylated

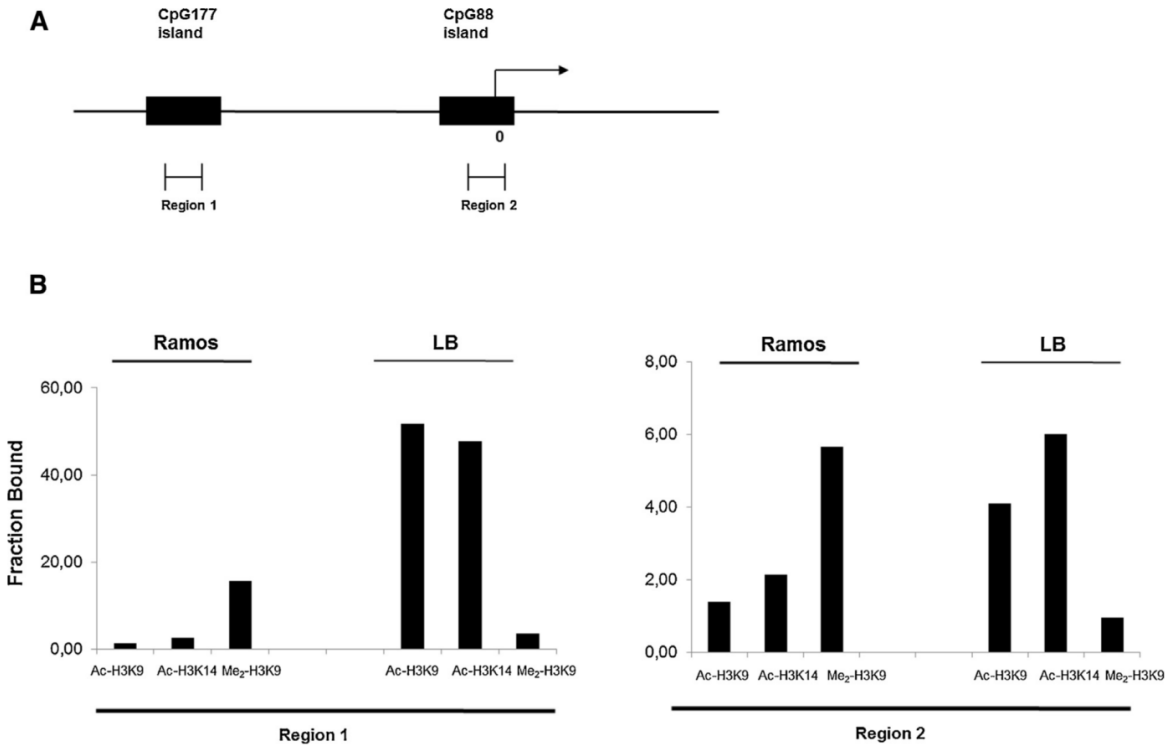


Fig. 6. Ramos cells are enriched with histone H3K9me2 and desacetylated compared to LB cells. (A) Two regions of the *HACE1* promoter were targeted by ChIP assay. (B) Quantitative ChIP assay of acetylated and methylated histone around the promoter *of HACE1*.

Table 2
QMPSF primers.

QMPSF Primers		
HACE1 Exon 1	F 5′-GATAGGGTTAGTCAGTTACATCTCGCCTGGGCCCGTCC-3′	R 5′-CGTTAGATAGTATCATGGCGGCGGCGGGTGTACTGTAG-3′
HACE1 Exon 2	F 5′-GATAGGGTTACCTCTGGTATTCTGCATTATTCTT-3′	R 5′-CGTTAGATAGTCAGCCATAACCATTGGCATTA-3′
HACE1 Exon 3	F 5′-GATAGGGTTAGCAGCTAAAGAGTTGTTAACTTGA-3′	R 5′-CGTTAGATAGCCGAATGCATAATTGACATCAAATT-3′
HACE1 Exon 4	F 5′-GATAGGGTTAAGTTTTCTTAAGTGGCTTAAGTTG-3′	R 5′-CGTTAGATAGAGAAAATAAAATATGCACCATTATTTTAGTTTTTCC-3′
HACE1 Exon 5	F 5′-GATAGGGTTACGCTGATGTCAACATTTGTAAT-3′	R 5′-CGTTAGATAGGAGATTGCAGTGAGCACAGATT-3′
HACE1 Exon 6	F 5′-GATAGGGTTAGCCCAGCTGAGAAATAACATTATT-3′	R 5′-CGTTAGATAGAAAACAAACACATGCAGCTTA-3′
HACE1 Exon 7	F 5′-GATAGGGTTAACTTTGCTTGCAGGTATGATATTT-3′	R 5′-CGTTAGATAGTGGGAAAACAAGAGAGCTTTAG-3′
LIN28B Exon 1	F 5′-GATAGGGTTACGGAGTGATCTTCTGCATCAA-3′	R 5′-CGTTAGATAGTTGACAAAGTCACGTGTGCTC-3′
GRIK2 Exon 16	F 5′-GATAGGGTTAAAAACCTCTTTTAGTAAGTTTCAAAAG-3′	R 5′-CGTTAGATAGGAATCTTCTATTTGGTTAGTGCCAC-3′
*TNFAIP3*Exon 2	F 5′-GATAGGGTTATGGATGTTTCTGTCGATGAGG-3′	R 5′-CGTTAGATAGAGAGAACTCCAGAAGACATTTTTAA-3′
*TNFAIP3*Exon 3	F 5′-GATAGGGTTAGCAGATTTGAGAGACTCCAGTTGC-3′	R 5′-CGTTAGATAGATGCATGCCACTTCTCAGTACAT-3′
*TNFAIP3*Exon 4	F 5′-GATAGGGTTAGGATGTTGCAAAGGACAAATAT-3′	R 5′-CGTTAGATAGATCAAAATGGCTTCCACAGAC-3′
IFNGR1 Exon 1	F 5′-GATAGGGTTAATGCTCACACCCTGCATGACAA-3′	R 5′-CGTTAGATAGTTGGAGGGCAGTGCTGGGCTGG-3′
CECR1 Exon 7	F 5′-GATAGGGTTAGAGCTCTCCAAGTGCATAAAT-3′	R 5′-CGTTAGATAGCCAGCTGATTTTTGCATTTTTAG-3′

Table 3
Pyrosequencing primers.

Forward	Reverse	Sequencing
5′-TTTGGAATGAATGGAAGGTTTAAT-3′	5′-Biotin-ACACCAAACCATTCCACTAAAACCCTAC-3′	5′-AATGAATGGAAGGTTTAATT-3′

human bisulphite-converted DNA was used as a control. The level of DNA methylation in the tumors was compared with the median level of methylation in nine normal lymph nodes.

2.8. Chromatin immunoprecipitation

Ramos cells and B lymphocyte control cells were treated with 100 nM TsA (or left untreated) as described earlier. ChIP was performed with a ChIP assay kit (Upstate) according to the manufacturer's protocol. Briefly, DNA and protein were cross-linked in culture with 1% formaldehyde. For each reaction, 1×10^6 cells were collected in 200 μL of SDS lysis buffer and sonicated to shear genomic DNA into fragments of 300–1000 bps. Lysates were diluted 1:10 with ChIP buffer and immunoprecipitated with the appropriate antibody overnight at 4 °C with agitation. α-Acetyl-histone H3 (Lys9/Lys14) antibodies (Upstate) were used to immunoprecipitate active chromatin fragments whereas α-dimethyl-histone H3 (Lys9) antibodies (Upstate) were used to immunoprecipitate inactive chromatin. Antibody complexes were recovered with protein A beads, and IgG antibody were used as a negative control. DNA was

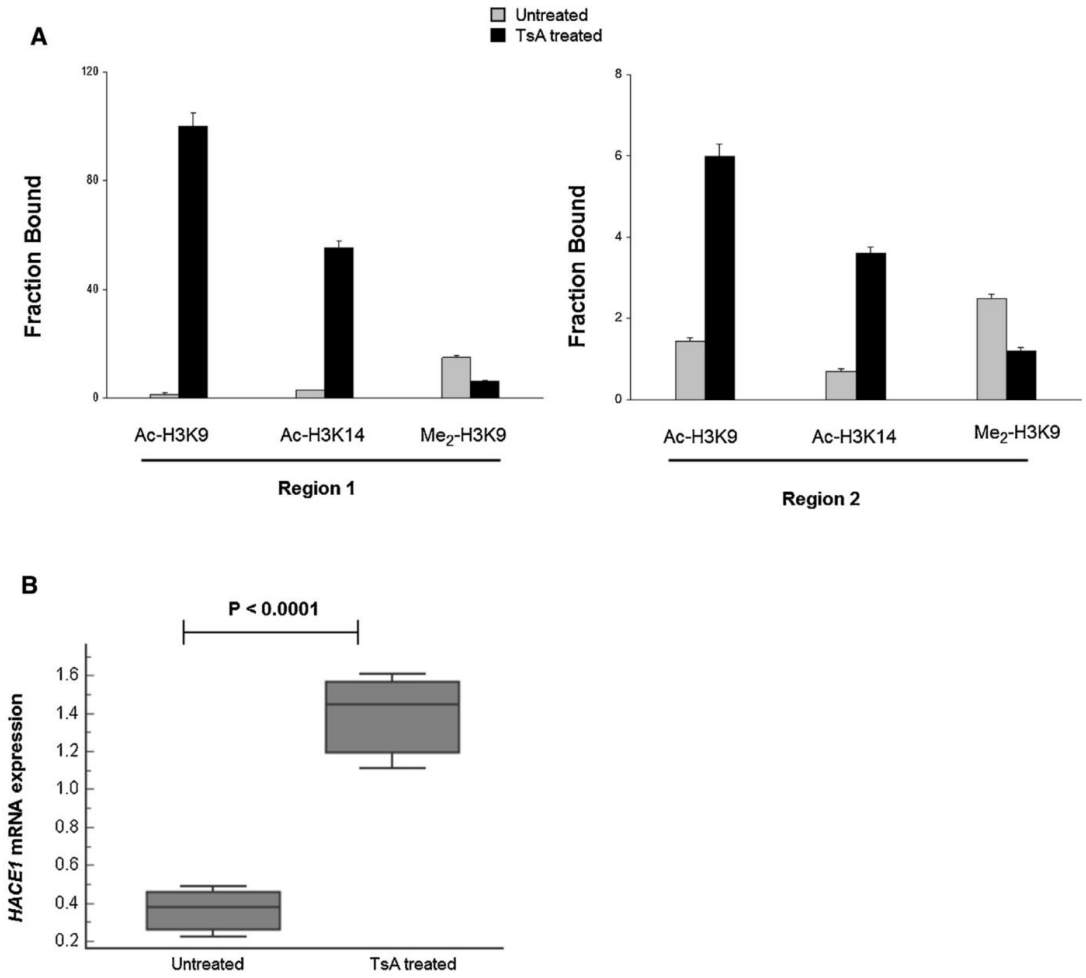


Fig. 7. Transcriptional silencing of *HACE1* in Ramos cells is associated with histone modifications. (A) Quantitative ChIP assay of histone modifications around the promoter by TSA treatment. The levels of acetylated (active marker) and methylated (repressive marker) Histone 3 (H3) were determined using antibodies directed against acetylated H3 and methylated H3 in Ramos cells treated with TsA or left untreated. The fraction bound represents the fold increase or decrease in the amount of the *HACE1* promoter in the acetyl-histone or methyl-histone antibody immunoprecipitated (IP) DNA normalized by the level of nonspecific IgG antibody immunoprecipitated DNA. Data are representative of three independent experiments. (B) Quantitative analysis of *HACE1* mRNA levels in untreated Ramos cells and those treated by TsA. Mann-Whitney test *p-value* <0.0001.

Table 4
ChIP primers.

	CpG177 island (region1)	CpG88 island (region2)
Forward	5′ACACGTCCTCACACCCTCTC-3′	5′CGGCTCACCCTCGGGCAACTCC-3′
Reverse	5′ TTCTTCCTGCTCCTCAGCAC-3′	5′CGGCGGCGGGTGTACTGTAGGTGGTC-3′

recovered by proteinase K digestion and phenol/chloroform extraction after washing and cross-link reversal. Equal sample volumes were used throughout all steps of the assay such that the quantity of recovered DNA could be compared between samples. The recovered DNA pellet was air dried and resuspended in 20 μL of H_2O. The amount of immunoprecipitated *HACE1* DNA was determined by qPCR using the Evagreen kit (Biorad) with primers overlapping the CpG-177 island and primers overlapping CpG-88 island (Supplementary materials Table 4).

2.9. *RNA interference against* HACE1

A pool of short hairpin interfering RNA (shRNA) lentiviral particles containing five target-specific constructs was used to knockdown the expression of *HACE1* in Ramos and Raji cells (Santa Cruz Biotechnology). Cells were transduced with lentiviral particles according to the manufacturer's instructions, and *HACE1*-deficient cells were selected with 4 μg/mL puromycin (Santa Cruz Biotechnology).

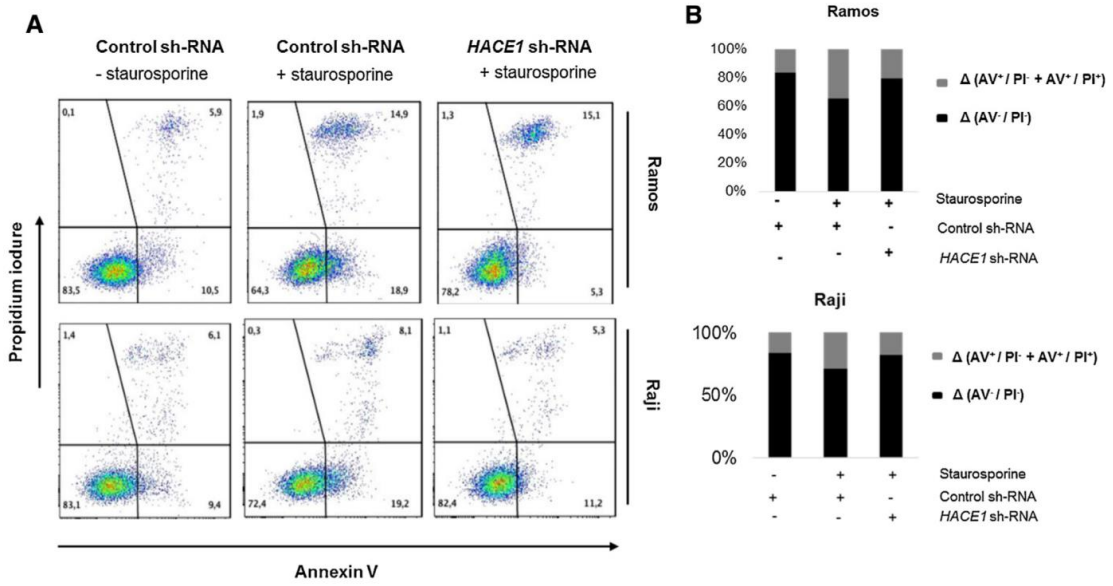


Fig. 8. Down-regulation of *HACE1* expression leads to resistance to staurosporine-induced-apoptosis in Ramos and Raji cell lines. (A) Staurosporine-induced cell death assayed by AV/PI double staining and flow cytometry. B-cell lymphoma cell lines Ramos and Raji transduced with control shRNA or anti- *HACE1* shRNA. Cells were stimulated with 10 μM staurosporine for three hours before apoptosis analysis. (B) The histograms represent the mean proportions of AV^-/PI^- and (AV^+/PI^- + AV^+/PI^+) cells obtained from three independent experiments.

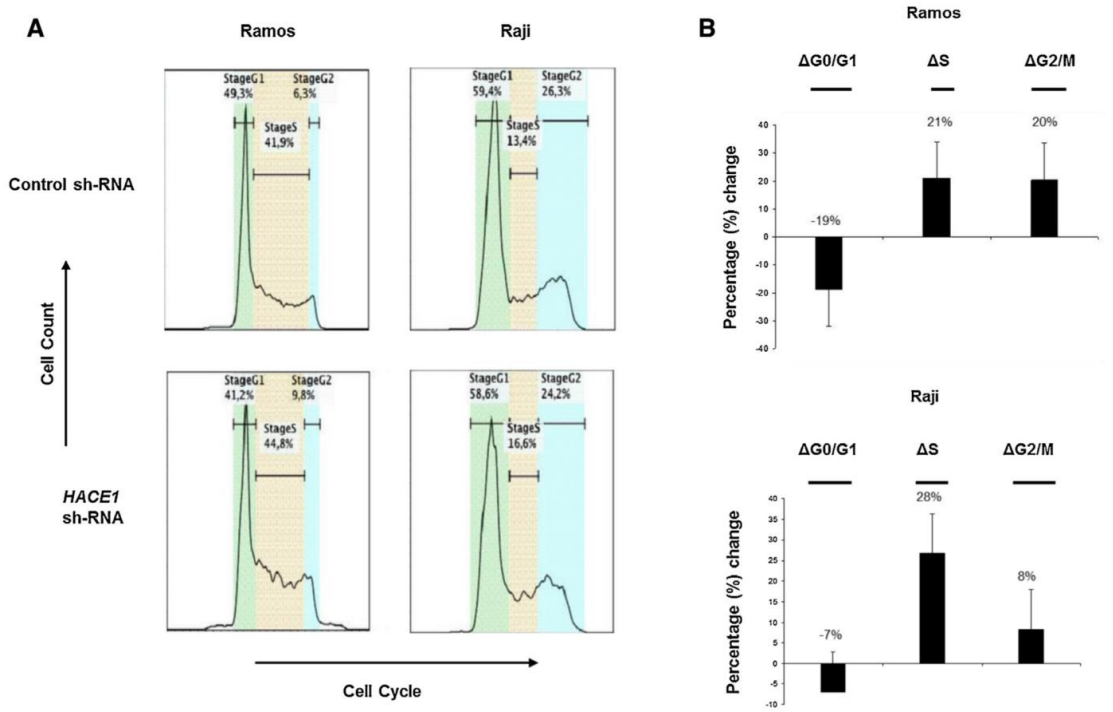


Fig. 9. Down-regulation of *HACE1* in Ramos and Raji cell lines increased cell accumulation in the S and G2/M phases. (A) Control shRNA- or *HACE1* shRNA-transduced Ramos or Raji cells were stained with propidium iodide. Cell cycle profiling for each population was determined by flow cytometry. (B) Graphic representation of variations in the percentage of cells at each stage of the cell cycle. *HACE1* down-regulation leads to S and G2/M phases cell cycle progression in Ramos and Raji cell lines. Data expressed as [(%*HACE1* sh-RNA/%control sh-RNA)-1) × 100] are means ± SD from three independent experiments.

2.10. Annexin V/propidium iodide staining and apoptosis analysis

Annexin V (AV)/propidium iodide (PI) labeling was performed with the Beckman coulter Apoptosis Assay Kit (Beckman) according to the manufacturer's instructions followed by flow cytometry analysis.

2.11. Flow cytometric analysis of the cell cycle

Transduced cells were fixed in cold 70% ethanol, washed, rehydrated in PBS, and stained with propidium iodide (PI) binding buffer (10 mg/mL RNase A and 10 μg/mL PI) for 30 min at room temperature. The DNA content of the cells was analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (Becton-Dickinson), and 10,000 events were collected.

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using Med-Calc (Medcalc Software) or R software. The nonparametric Mann-Whitney test was performed to statistically examine different expression or methylation and deletion patterns between groups. The limit of significance for all analyses was defined as a P-value of 0.05.

3. Results

3.1. HACE1 *is down-expressed in tumor samples and cell lines derived from B-cell malignancies compared with normal B-cells*

We determined *HACE1* mRNA levels by real-time PCR. *HACE1* transcripts were amplified with primers specific for the 19th and 20th exons, which amplify all *HACE1* isoforms, and *TBP* was also amplified as an internal control for normalization. The *HACE1* mRNA levels were lower in tumor samples than in normal lymph nodes (Fig. 1A). We then performed Q-RT-PCR to examine the expression levels of *HACE1* mRNA in four cell lines from various B lymphoid malignancies. Although the expression of *HACE1* mRNA varied among the cell lines examined, the abundance of *HACE1* mRNA was lower in the four cell lines than in B lymphocyte control cells from peripheral blood (Fig. 1B). Differential levels of HACE1 cytoplasmic protein, but not nuclear protein, were found among the DLBCL tumors. Fifty-three percent of cases displayed strong expression (+++), 10% intermediate expression (++) and 37% weak expression (+) (Fig. 2). These data, when taken together, confirm that HACE1 can be down-regulated in some B-cell lymphoma tumors.

3.2. *Deletions in* HACE1 *are common and lead to gene down-regulation in tumors*

We sought to identify the mechanism resulting in the down-regulation of *HACE1*; therefore, we determined the copy number of *HACE1* in 91 DLBCL samples and the four cell lines. Heterozygous deletions of *HACE1* were observed in 40% of cases (36/91). Moreover, seven of the 36 deletions (20%) were specifically located in the *HACE1* gene (Fig. 3A). *HACE1* was not deleted in any of the B-cell lymphoma cell lines and in B lymphocyte control cells from peripheral blood. *HACE1* mRNA levels were significantly lower in patients with deletions than in patients without deletions (Fig. 3B).

3.3. *The CpG177 island in the* HACE1 *promoter is hypermethylated in B-cell lymphoma*

We also sought to determine whether epigenetic mechanisms contribute to the down-regulation of HACE1 expression. To evaluate the association between DNA methylation status and HACE1 expression in B-lymphoma cases, we firstly used methylation-sensitive PCR (MS-PCR) to assess the pattern of DNA methylation within two defined CpG islands (CpG88 and CpG 177). We found a better evidence for cytosine methylation at CpG-177 than the CpG island around the HACE1 TSS called CpG88 (data not shown). Thus, we performed pyrosequencing to quantify methylation at CpG177 sites in the HACE1 promoter in samples and cell lines. The "methylated" status was assigned to every site/sample pair with a methylation level significantly higher than normal lymph nodes samples in the same site. A CpG site was considered "methylated" in every sample showing a methylation level significantly higher than normal lymph node samples in the considered site ($p < 0.05$). Probabilities were computed considering the methylation levels observed in lymph node samples as normally distributed, with means ranging from 21.0% to 37.8% and standard deviations from 0.0346% to 0.0740%. Bonferroni corrections for multiple testing were finally applied site by site, resulting in de facto thresholds ranging between 37.3% and 56.7% from a CpG site to another. (Fig. 4A). These pyrosequencing results revealed that CpG177 is hypermethylated in a large proportion of patient samples (60%) compared with the normal lymph nodes. All cell lines examined were also hypermethylated whereas B lymphocyte control cells from peripheral blood. Otherwise, we did not find any correlation between methylation levels and HACE1 gene expression (Fig. 4B).

3.4. *The DNA methyltransferase inhibitor 5Aza-dC did not affect* HACE1 *expression in B-cell lymphoma cell lines despite its demethylation effect*

Then, we tested the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-dC on *HACE1* expression in B-cell lymphoma cell lines (Fig. 2A in Supplementary data). Cell lines (Ramos, RL and Raji cells) were treated with 5-Aza-dC during 5 days (or left untreated), and *HACE1* mRNA were determined by Q-RT-PCR. We found that 5-Aza-dC did not modify the level of *HACE1* mRNA expressed in any of the cell lines despite its demethylation effect (Fig. 2B in Supplementary data). These results suggest that DNA methylation is not directly involved in the down-regulation of *HACE1* expression in these cell lines.

3.5. *HDAC inhibitors (TsA) increase* HACE1 *expression in B-cell lymphoma cell lines*

We inspected the effect of HDAC inhibitors, TsA, on *HACE1* expression in B-cell lymphoma cell lines to understand the mechanisms causing altered *HACE1* expression. The cell lines (Ramos, RL and Raji) were treated with TsA for 24 h (or left untreated), and *HACE1* mRNA levels were determined by Q-RT-PCR (Fig. 5). For each of the cell lines tested, *HACE1* mRNA levels were higher in cells treated with TSA than in untreated cells. These results suggest that histone hypoacetylation is partly responsible for the down-regulation of *HACE1* expression in B-cell lymphoma cell lines. Thus, it appears that the down-regulation of expression of *HACE1* in cell lines is partly due to epigenetic regulation involving histone acetylation.

3.6. *The* HACE1 *promoter presents inactivating histone marks in Ramos cell line*

We performed ChIP assays with polyclonal antibodies against acetylated histone H3 to examine the acetylation status of H3 histones associated with *HACE1* gene promoter in the B-lymphoma cell line Ramos and B lymphocyte control cells from peripheral blood. In particular, we analyzed those histones associated with *HACE1* promoter around the CpG88 and CpG177 islands (Fig. 6A). Levels of histone H3 acetylation in the *HACE1* promoter were lower in Ramos cells compared to B lymphocyte control cells (Fig. 6B). Treatment

of Ramos cells with TsA resulted in acetylation level increase of histone H3 and increased *HACE1* expression (Fig. 7A and B), suggesting that the low expression of *HACE1* in this B-cell lymphoma cell line is partly due to the hypoacetylation of histone H3.

As well we examined the methylation status of histone H3-lysine (K) 9 by ChIP because methylation at this residue is associated with inactive genes. In Ramos cells we found the *HACE1* promoter region to be enriched with dimethylation of Lysine 9 on histone H3 (H3K9me2) as compared to LB cells (Fig. 6B). ChIP assay with TsA treatment showed reduced expression of the H3K9me2 histone mark in the treated Ramos cells within the *HACE1* promoter. This suggests that hypermethylation of histone H3-K9 may be involved in the down-regulation of *HACE1* gene expression in Ramos cells. Collectively, these results indicate that epigenetic mechanisms play an important role in the down-regulation of *HACE1* expression in B-lymphoma cells.

3.7. *Down-regulation of* HACE1 *in lymphoma cell lines leads to cell cycle progression and resistance to staurosporine-induced apoptosis*

HACE1 regulates proteins that control cell survival, such as cyclin D1. We sought to analyze the role of *HACE1* in the control of apoptosis and cell cycle in Ramos and Raji cells; therefore, we inhibited *HACE1* expression by shRNA targeting *HACE1* (Fig. 3 in Supplementary data). We treated transduced Ramos and Raji cells with 10 μM staurosporine for 3 h to induce apoptosis and analyzed apoptosis levels by annexin/PI staining. In Ramos and Raji cells transduced with control shRNA, staurosporine treatment resulted in 34% and 27% apoptosis, respectively. However, in cells transduced with *HACE1* shRNA, staurosporine treatment led to apoptosis in approximately 21% of Ramos cells and 16% of Raji cells (Fig. 7A). In addition, the proportion of viable cells following staurosporine treatment was higher among cells transduced with *HACE1* shRNA than among cells transduced with control shRNA (Fig. 7B). These results demonstrate that the down-regulation of *HACE1* expression in B-lymphoma cells confers resistance to staurosporine-induced apoptosis, suggesting that *HACE*1 is involved in the regulation of apoptosis in these cells. We subsequently used flow cytometry to monitor differences in cell cycle distribution between control cells (transduced with control shRNA) and cells transduced with *HACE1* shRNA. The proportion of cells in the G1 phase was significantly lower in the *HACE1*-deficient cells than in control cells. The same trend was observed among cells in the S and G2/M phases (Fig. 8). This suggests that the down-regulation of *HACE1* expression induces cell cycle progression at the S and G2/M checkpoints.

4. Discussion

4.1. *Here, we found that* HACE1 *is down-expressed in B cell lymphoma*

The *HACE1* gene, which is located at 6q16.3, has been shown to be altered in T cell malignancies [12] through deletion and DNA methylation, and its alteration may play a crucial role in NK cell lymphomagenesis [12]. However, *HACE1* expression in B-cell lymphoma, the most common type of lymphoma, had not been explored. Here, we found that *HACE1* downregulation was due, at least in part, to deletion and altered epigenetic regulation. Deletions of the long arm of chromosome 6 occur at a relatively high frequency (50%) in leukemia/lymphoma, and they are frequently observed in 6q21 [20]. In our study, the copy number analysis of this region in B-cell lymphoma tumors showed that a 6q deletion occurs in approximately 40% of patients. These deletions result in the down-regulation of expression of *HACE1* and other tumor suppressor genes such as *TNFAIP3* [21]. Furthermore, we identified heterozygosis deletions specifically involving *HACE1* and not other genes located within 6q region, which strongly supports our hypothesis that *HACE1* is a haploinsufficient tumor suppressor gene in B cell lymphoma. Haploinsufficiency or abnormalities in several tumor suppressor genes at this locus (*TNFAIP3, PRDM1, HACE1*) may provide an additive or synergistic growth advantage during the neoplastic transformation of LB cells [8,22]. Nevertheless, in B-cell lymphoma cell lines, the expression of *HACE1* was down-regulated despite the presence of two intact copies of the gene. Consequently, the expression of *HACE1* may be down-regulated through another mechanism, such as epigenetic regulation [22–24]. We found that *HACE1* was methylated at CpG177 in 60% of cases studied and in all B-cell lymphoma cell lines tested. However, cytosine methylation did not correlate with *HACE1* transcription. In addition, the treatment of B cell lymphoma cell lines with 5-Aza-dC did not affect *HACE1* expression, despite the observed demethylation at the *HACE1* promoter. Although DNA methylation was originally reported to be involved in gene silencing [25,26] recent studies have found that DNA methylation can also be positively correlated with transcription or show no correlation at all [27]. To try understanding these results we used HDAC inhibitor treatment. Thus, treatment of B-cell lymphoma cell lines with histone deacetylase inhibitors (TsA) activated *HACE1* expression. However, the combination of 5-Aza-dC and TsA was not more effective at inducing *HACE1* expression than was TsA alone. The effect of histone deacetylase inhibitors on *HACE1* expression suggests that chromatin modulation plays an important role in regulating *HACE1* expression. Indeed, histone modifications also play an important role in gene silencing, and many histone marks are associated with transcriptional repression [29,30]. Indeed, histone deacetylation would cause chromatin condensation and repression of gene transcription. Thus, ChIP analysis showed that histone methylation marks associated with gene silencing were enriched at the *HACE1* promoter in B-cell lymphoma cell lines (Ramos) compared to lymphocyte control cells from peripheral blood. Furthermore, TsA-induced expression of *HACE1* correlated with high increase of histone H3 acetylation and a decrease of dimethylated histone H3K9 at the *HACE1* promoter. Recent studies have identified important interplay between DNA methylation and histone methylation and acetylation [2]. Indeed, DNA methylation can induce chromatin remodeling leading to the formation of repressive domains by causing massive histone deacetylation at the methylated sites. Furthermore, hypermethylated CpG islands attract methyl-CpG binding domain proteins (MBDP: MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 iKaiso) in a self-perpetuating loop and recruit HDACs, leading to transcriptional repression [2]. However, Bachman et al. used a genetic approach to show that histone modification can occur independently of DNA methylation and that DNA methylation serves to 'lock in', rather than initiate gene repression [31]. Our results also provide an example of this interplay between DNA methylation and histone modifications (methylation and acetylation). Further research will be required to clear this question (Fig. 9).

The various identified targets of HACE1 (RAC1, RAR and cycline D1) suggest its involvement in cell proliferation and survival, which are important for lymphomagenesis [6,7]. Indeed, it was shown that Rac1 Inhibited apoptosis in Human Lymphoma Cells by Stimulating Bad Phosphorylation on Ser-75 [32]. Regarding Cyclin D1, a protein with known oncogenic potential, is downregulated in normal mature B lymphocytes. Its high expression detected in a number of malignancies, including B-cell lymphomas, may be important for oncogenesis [33]. Moreover, Manshouri et al. suggested that RARα is necessary for appropriate response of the RARβ and RARγ genes to physiologic changes and deregulation of the RARα in transgenic mice, which resulted in upregulation of RARβ and RARγ, can be associated with lymphomagenesis [34]. A recent

study reported that up-regulation of *HACE1* expression can lead to apoptosis and G2/M cell-cycle arrest in T cell malignancies [12]. In our study, down-regulation of *HACE1* expression by shRNA promoted resistance to apoptosis and S and G2/M cell cycle progression in two B-cell lymphoma cell lines. We first chose to down-express *HACE1* in ramos and raji despite of its low expression in these cell lines to observe the potent role of tumor suppressor of *HACE1*. We will have to re-express *HACE1* in these cell lines to confirm these results. Finally, *HACE1* is a putative tumor suppressor gene located within the 6q16.3 region, and our data provide a comprehensive characterization of the epigenetic mechanisms leading to *HACE1* deregulation in B-cell lymphoma tumors. These results support the notion that control of *HACE1* expression in these tumors is associated with chromatin modifications. These findings show why treatment with HDAC inhibitors can increase *HACE1* expression. *HACE1* re-expression and patterns of methylation and acetylation provide a rationale to test epigenetic therapy in B-cell lymphoma patients.

Funding information

This work was supported by la ligue régional de la lutte contre le cancer.

Acknowledgement

This work was supported by la ligue régionalde la lutte contre le cancer.

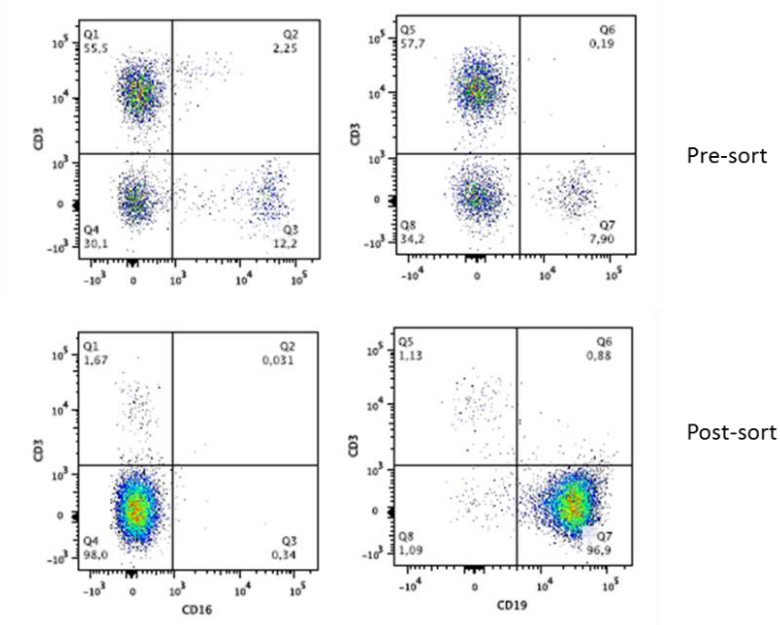
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2016.04.007.

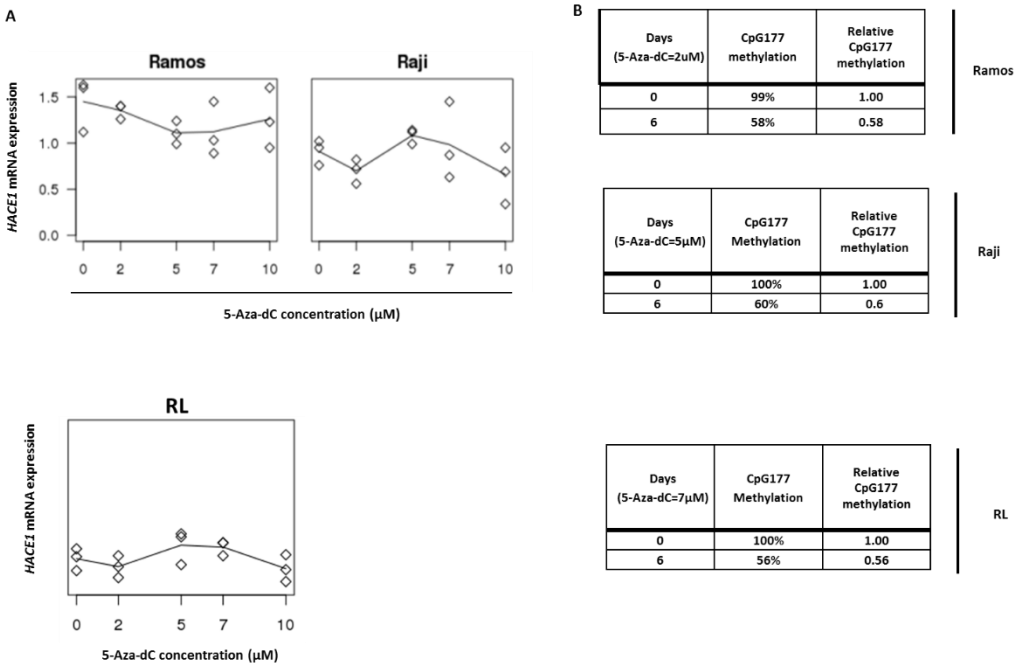
References

[1] S.B. Baylin, J.G. Herman, DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics, Trends Genet. TIG 16 (2000) 168–174.
[2] F. Fuks, DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes, Curr. Opin. Genet. Dev. 15 (2005) 490–495.
[3] L. Zhang, M.S. Anglesio, M. O'sullivan, F. Zhang, G. Yang, R. Sarao, P.N. Mai, S. Cronin, H. Hara, N. Melnyk, L. Li, T. Wada, P.P. Liu, J. Farrar, R.J. Arceci, P.H. Sorensen, J.M. Penninger, The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers, Nat. Med. 13 (2007) 1060–1069.
[4] M.S. Anglesio, V. Evdokimova, N. Melnyk, L. Zhang, C.V. Fernandez, P.E. Grundy, S. Leach, M.A. Marra, A.R. Brooks-Wilson, J. Penninger, P.H.B. Sorensen, Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney, Hum. Mol. Genet. 13 (2004) 2061–2074.
[5] J. Zhao, Z. Zhang, Z. Vucetic, K.J. Soprano, D.R. Soprano, HACE1: a novel repressor of RAR transcriptional activity, J. Cell Biochem. 107 (2009) 482–493.
[6] A. Mettouchi, E. Lemichez, Ubiquitylation of active Rac1 by the E3 ubiquitin-ligase HACE1, Small GTPases 3 (2012) 102–106.
[7] M. Daugaard, R. Nitsch, B. Razaghi, L. McDonald, A. Jarrar, S. Torrino, S. Castillo-Lluva, B. Rotblat, L. Li, A. Malliri, E. Lemichez, A. Mettouchi, J.N. Berman, J.M. Penninger, P.H. Sorensen, Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes, Nat. Commun. 4 (2013) 2180.
[8] S.J. Diskin, M. Capasso, R.W. Schnepp, K.A. Cole, E.F. Attiyeh, C. Hou, M. Diamond, E.L. Carpenter, C. Winter, H. Lee, J. Jagannathan, V. Latorre, A. Iolascon, H. Hakonarson, M. Devoto, J.M. Maris, Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma, Nat. Genet. 44 (2012) 1126–1130.
[9] K. Hibi, M. Sakata, K. Sakuraba, A. Shirahata, T. Goto, H. Mizukami, M. Saito, K. Ishibashi, G. Kigawa, H. Nemoto, Y. Sanada, Aberrant methylation of the HACE1 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer, Anticancer Res. 28 (2008) 1581–1584.
[10] M. Sakata, K. Yokomizo, Y. Kitamura, K. Sakuraba, A. Shirahata, T. Goto, H. Mizukami, M. Saito, K. Ishibashi, G. Kigawa, H. Nemoto, K. Hibi, Methylation of the HACE1 gene is frequently detected in hepatocellular carcinoma, Hepatogastroenterology 60 (2013) 781–783.
[11] M. Sakata, Y.-H. Kitamura, K. Sakuraba, T. Goto, H. Mizukami, M. Saito, K. Ishibashi, G. Kigawa, H. Nemoto, Y. Sanada, K. Hibi, Methylation of HACE1 in gastric carcinoma, Anticancer Res. 29 (2009) 2231–2233.
[12] C. Küçük, X. Hu, J. Iqbal, P. Gaulard, D. Klinkebiel, A. Cornish, B.J. Dave, W.C. Chan, HACE1 is a tumor suppressor gene candidate in natural killer cell neoplasms, Am. J. Pathol. 182 (2013) 49–55.
[14] T.E. Witzig, G. Hu, S.M. Offer, L.E. Wellik, J.J. Han, M.J. Stenson, A. Dogan, R.B. Diasio, M. Gupta, Epigenetic mechanisms of protein tyrosine phosphatase 6 suppression in diffuse large B-cell lymphoma: implications for epigenetic therapy, Leukemia 28 (2014) 147–154.
[17] F. Casilli, Z.C. Di Rocco, S. Gad, I. Tournier, D. Stoppa-Lyonnet, T. Frebourg, M. Tosi, Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments, Hum. Mutat. 20 (2002) 218–226.
[18] F. Jardin, P. Ruminy, J.-P. Kerckaert, F. Parmentier, J.-M. Picquenot, S. Quief, C. Villenet, G. Buchonnet, M. Tosi, T. Frebourg, C. Bastard, H. Tilly, Detection of somatic quantitative genetic alterations by multiplex polymerase chain reaction for the prediction of outcome in diffuse large B-cell lymphomas, Haematologica 93 (2008) 543–550.
[19] F. Jardin, J.-P. Jais, T.-J. Molina, F. Parmentier, J.-M. Picquenot, P. Ruminy, H. Tilly, C. Bastard, G.-A. Salles, P. Feugier, C. Thieblemont, C. Gisselbrecht, A. de Reynies, B. Coiffier, C. Haioun, K. Leroy, Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study, Blood 116 (2010) 1092–1104.
[20] E.F. Thelander, K. Ichimura, M. Corcoran, G. Barbany, A. Nordgren, M. Heyman, M. Berglund, A. Mungall, R. Rosenquist, V.P. Collins, D. Grandér, C. Larsson, S. Lagercrantz, Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia, Leuk. Lymphoma 49 (2008) 477–487.
[21] K. Honma, S. Tsuzuki, M. Nakagawa, H. Tagawa, S. Nakamura, Y. Morishima, M. Seto, TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas, Blood 114 (2009) 2467–2475.
[22] S.B. Baylin, J.G. Herman, J.R. Graff, P.M. Vertino, J.P. Issa, Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia, Adv. Cancer Res. 72 (1998) 141–196.
[23] S.B. Baylin, S.A. Belinsky, J.G. Herman, Aberrant methylation of gene promoters in cancer—concepts, misconcepts, and promise, J. Natl. Cancer Inst. 92 (2000) 1460–1461.
[24] P.A. Jones, S.B. Baylin, The epigenomics of cancer, Cell 128 (2007) 683–692.
[25] J.G. Herman, S.B. Baylin, Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation, N. Engl. J. Med. 349 (2003) 2042–2054.
[26] R. Holliday, J.E. Pugh, DNA modification mechanisms and gene activity during development, Science 187 (1975) 226–232.
[27] R. Lister, J.R. Ecker, Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation, Genome Res. 19 (2009) 959–966.
[29] J. Nakayama, J.C. Rice, B.D. Strahl, C.D. Allis, S.I. Grewal, Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly, Science 292 (2001) 110–113.
[30] M. Iizuka, M.M. Smith, Functional consequences of histone modifications, Curr. Opin. Genet. Dev. 13 (2003) 154–160.
[31] K.E. Bachman, B.H. Park, I. Rhee, H. Rajagopalan, J.G. Herman, S.B. Baylin, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene, Cancer Cell 3 (2003) 89–95.
[32] B. Zhang, Y. Zhang, E. Shacter, Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating bad phosphorylation on Ser-75, Mol. Cell. Biol 14 (2004) 6205–6214.
[33] A. Gladkikh, D. Potashnikova, E. Korneva, O. Khudoleeva, I. Vorobjev, Cyclin D1 expression in B-cell lymphomas, Exp. Hematol. 38 (2010) 1047–1057.
[34] T. Manshouri, Y. Yang, H. Lin, S.A. Stass, A.B. Glassman, M.J. Keating, M. Albitar, Blood 89 (1997) 2507–2515.

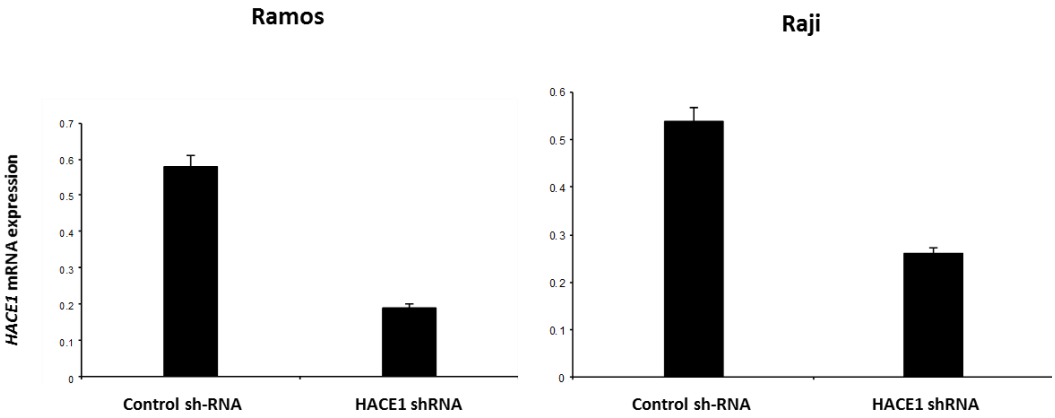
Supplementary data



Supplementary figure 1: LB (CD19+) purification



Supplementary figure 2: No effect of 5-Aza-dC on *HACE1 re*-expression in B-cell lymphoma.
A: Effect of 5-Aza-dC on CpG177 demethylation detected by pyrosequencing in Ramos,RL and Raji cells**. B:** Effect of 5-Aza-dC on *HACE1* expression in Ramos, RL and Raji cells measured by QRT-PCR.



Supplementary figure 3: Down-regulation of *HACE*1 expression by shRNA in Ramos and Raji cell lines. A pool of short hairpin interfering RNA lentiviral particles containing five target-specific constructs transfected Ramos and Raji cells. *HACE1*-deficient cells were selected with 4Ug/ml puromycin.

Heterogeneous epigenetic regulation of *HACE1* in B-Lymphoma cells

Abdelilah Bouzelfen[1], Hafid Kora[2,] Marion Alcantara[1], Jean-Michel Picquenot[1], Philippe Bertrand[1], Sylvain Mareschal[1], Catherine Maingonnat[1], Christian Bastard[1], Hervé Tilly[1], Jean-Baptiste Latouche[2], Fabrice Jardin[1].

Corresponding author: bouzelfi.a@gmail.com

[1] Henri Becquerel Center, IINSERM U918, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (iRiB),

Rouen

[2] INSERM U1079, Faculty of Medicine of Rouen, iRiB

Funding information: This work was supported by la Ligue Régional de la Lutte Contre le Cancer

Keywords: 3-Deazaneplanocin A, B-cell lymphoma, HACE1, histone methylation, DNA methylation, epigenetics

Abstract

We examined the consequences of 3-deazaneplanocin A (DZNep) on *HACE1* expression in human B-cell Lymphoma to investigate fundamental molecular mechanisms that control its expression. We treated the human B-lymphoma cell lines Ramos and Raji with DZNep and examined *HACE1* mRNA expression by RT-PCR. We also studied the effect of DZNep on the methylation of lysine 9 and 27 of histone 3 (H3K27me3 and H3K9me2) associated with the CpG88 and CpG177 islands of the *HACE1* promoters by chromatin immunoprecipitation and quantitative PCR. CpG88 (poorly methylated) of the *HACE1* promoter was enriched for histone marks H3K27me3 and H3K9me2 whereas CpG177 (hypermethylated) was only enriched for H3K9me2. DZNep treatment increased *HACE1* gene expression which was further increased by the addition of trichostatine A (TSA), a promising therapeutic compound for the treatment of human B-Lymphoma. Histone methylation (both H3K9me2 and H3K27me3) of the *HACE1* promoter concomitantly decreased. Our experiments suggest that *HACE1* can be downregulated by methylation of its promoter region chromatin (H3K27me3 and H3K9me2), making *HACE1* a potential target for DZNep combined with TSA. These results highlight the heterogeneity of *HACE1* regulation in B-lymphoma and suggest that successful drug-induced restoration of epigenetically silenced tumor suppressor genes will require accurate characterization of cell type- and locus-specific gene silencing mechanisms

Introduction

Epigenetic modification regulates transcription by altering the structure of chromatin without affecting the DNA sequence. Chromatin has a highly ordered structure and consists of DNA and chromosomal proteins, including histones and non-histone proteins. Epigenetic modifications can occur on both DNA and histones. DNA methylation mostly takes place in promoter regions containing repetitive CpG dinucleotides, also known as CpG islands, and usually results in the transcriptional silencing of downstream genes. Histone modification consist mostly of the methylation and acetylation of specific amino acids at the N-terminus of histones. These modifications can either open or close the chromatin structure to affect the binding of transcriptional factors to the promoters, thus activating or silencing the affected genes[1].

HACE1 is a tumor suppressor gene that encodes a ubiquitin ligase E3 located within the 6q16.3 region. We previously characterized the epigenetic mechanisms leading to transcriptional repression of *HACE1* in B-cell lymphoma tumors and cell lines[2]. The results of this previous study are consistent with the control of *HACE1* expression in these tumors by chromatin modification. The mechanisms involved in the transcriptional repression of *HACE1* are only partially understood, but evidence suggests that promoter hypermethylation (at CpG177) may not be the primary epigenetic alteration in B-cell Lymphoma[2]. We previously showed that *HACE1* expression was lower in B-lymphoma tumors than in control samples and cell lines. However, we found that cytosine hypermethylation (at CpG177) did not correlate with *HACE1* transcription. Moreover, *HACE1* hypermethylation was only observed in the region of CpG177 but not CpG88, and treatment of B-Lymphoma cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) did not restore *HACE1* expression.

We postulated that *HACE1* expression could be upregulated by the inhibitor of histone methylation, 3-Deazaneplanocin A (DZNep), because B-lymphoma cells did not exhibit abnormal *HACE1* methylation in the region of CpG88 in this study. Indeed, the inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy) hydrolase, DZNep, inhibited the methylation of histone H3 lysine 27 (H3K27) via the depletion of polycomb-recessive complex 2 (PRC2)[3] in genes which are not regulated by DNA methylation[4]. Later studies demonstrated that it is a global inhibitor of histone methylation, including the methylation of H3K9[5,6,7] and induces apoptotic cell death, and inhibits cell proliferation and migration of cancer cells[3,5,8]. The effects of DZNep on cancer cells suggest that it may regulate tumor suppressor gene expression, or oncogene expression, by altering their histone methylation status [4].

The differential DNA methylation of the CpG islands of the *HACE1* gene in the DZNep-induced upregulation of *HACE1* expression suggests that CpG88 plays a more important role in *HACE1* expression than CpG177 which is a hypermethylated island and is not involved in *HACE1* expression. Thus, combining of histone modification agents could restore *HACE1* expression in B-cell lymphoma tumors harboring unusual histone modifications at the *HACE1* promoter.

Materials and methods

Cell lines and culture conditions

The B-cell lymphoma cell lines Ramos (Burkitt lymphoma) and RAJI (Burkitt lymphoma) were obtained from the ATCC. The cell lines were maintained in RPMI1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, and 2 mmol/L glutamine. Cells were grown and maintained at 37°C in a humidified 5% CO2 atmosphere. Ramos and RAJI were treated with DZNep (Cayman, final conc. 1.4) for 72 h followed by Trichostatin A (TsA, Sigma, final conc. 100 nM) for 24 h.

ADAM assay

Before and after treatment with DZNep viability of Ramos and Raji Cell lines was measured using an automatic counter cell ADAM (Washington, NanoEntek, MA). Using a kit containing a propidium iodide solution (solution T) and a solution N. The T solution is a fluorescent dye which allowing staining DNA of all cells and N solution allowing detection of all non-viable cells. The difference between these two parameters (T-N) provides the number of viable cells.

Normal B-cell isolation

Fresh blood from healthy donors (HDs) was collected by the Etablissement Français du Sang. Mononuclear cells isolated from peripheral blood were prepared by Ficoll gradient centrifugation, and B cells were isolated by negative selection using the Dynabeads untouched B-cell kit (Dynal Life Technologies) (Figure supplementary data).

Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and 1 µg of RNA was converted into cDNA in a random-primer synthesis reaction using the M-MLV reverse transcriptase kit (Life Technologies). All primer/probe sets were designed to span exon boundaries to eliminate contaminating signal from genomic DNA. the *HACE1* gene-specific primer/probe set (forward: AGTTATTCAGTGGTTCT, probe: [6FAM]CGGGCAGTTCCAGGGTCCCAC [TAMRA], reverse: ACTTCCACCCATGATATTAGCAAAC) was multiplexed using the VIC-MGB-labeled TBP endogenous control primer/probe kit (Applied Biosystems). PCR was carried out using a TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems) under standard conditions. An ABI 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) was used to run the PCRs and measure fluorescence at each cycle. Each PCR reaction was performed in triplicate at least twice.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Ramos and RAJI cells were treated with 1.4 (or left untreated) as described earlier. ChIP was performed using a ChIP assay kit (Upstate) according to the manufacturer's protocol. Briefly, DNA and protein were cross-linked in culture with 1% formaldehyde. For each reaction, 1×10^6 cells were collected in 200 µl SDS lysis buffer and sonicated to shear genomic DNA into fragments of 300–1000 bps. Lysates were diluted 1:10 with ChIP buffer and immunoprecipitated using the appropriate antibody overnight at 4°C with agitation: α-trimethyl-histone H3 (Lys27) and dimethyl-histone H3 (Lys 9) antibodies (Upstate) were used to precipitate the immunoprecipitation of inactive chromatin. Antibody complexes were recovered using protein A beads, with the IgG antibody as a negative control. DNA was recovered by proteinase K digestion and phenol/chloroform extraction after washing and cross-link reversal. Equal sample volumes were used throughout all steps of the assay such that the

quantity of recovered DNA could be compared between samples. The recovered DNA pellet was air dried and resuspended in 20 µl H_2O. We determined the quantity of immunoprecipitated *HACE1* DNA by qPCR using the Evagreen kit (Biorad), with primers overlapping the CpG177 and CpG88 islands (Table supplementary materials).

	CpG177 island (region1)	**CpG88 island (region2)**
Forward	5'ACACGTCCTCACACCCTCTC-3'	5'CGGCTCACCCTCGGGCAACTCC-3'
Reverse	5' TTCTTCCTGCTCCTCAGCAC-3'	5'CGGCGGCGGGTGTACTGTAGGTGGTC-3'

Table : **ChIP primers**

Results

DZNep Inhibits the Growth of B-Lymphoma Cells

We examined the effect of DZNep on the growth of Ramos cells following treatment with DZNep at concentrations between 0.35 µM and 22.4 µM. We determined the number of living cells after treatment using the ADAM assay. DZNep significantly inhibited the growth of Ramos cells in a dose-dependent manner. A concentration of 1.4 µM DZNep inhibited cell growth by approximately 50% (Figure 1) and was used for all subsequent experiments.

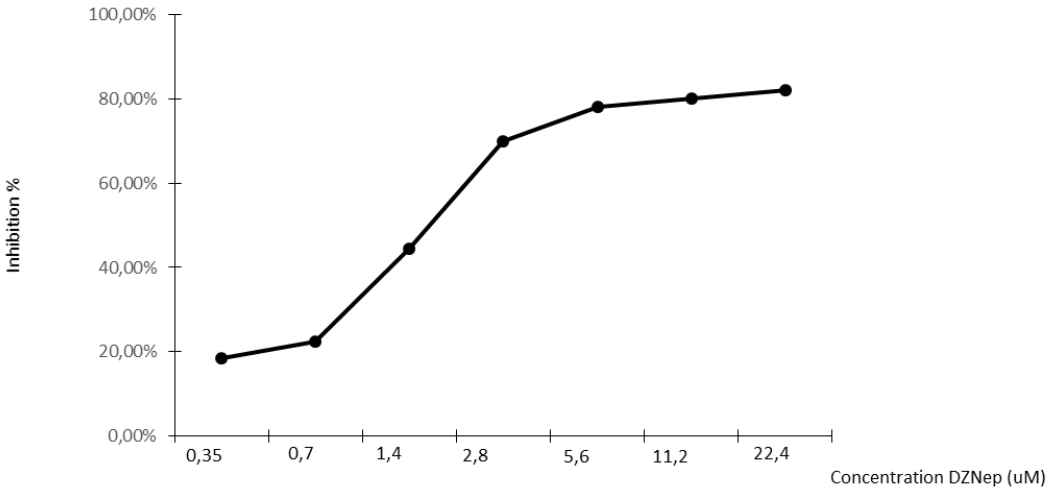


Figure 1: Inhibitory effect of DZNep on the growth of B-lymphoma cells.
Ramos cells were treated with 0.35 to 22.4 mM DZNep for 48 h. The number of living cells was determined by measuring the absorbance at 450 nm after the addition of propidium iodure. Untreated Ramos cells were used as the control. The differences in the number of living cells between the treatment and control groups are expressed as the percentage of inhibition. The data are derived from two separate experiments in triplicate per condition.

Histone methyl inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep) promotes the expression of *HACE1* in B-lymphoma cells.

DZNep, a H3K27me3 histone methyl inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep) can reactivate tumor suppressor genes that are usually down-regulated in lymphoma cells. We thus studied the effect of DZNep on transcription of the tumor suppressor gene *HACE1* in B-cell lymphoma cells. We treated the Ramos and Raji cell lines with 0 and 1.4 µM of the inhibitor and measured

gene expression by determining the level of mRNA using quantitative RT-PCR. The level of *HACE1* mRNA cells was significantly higher in both cell lines than in control B lymphocytes (Figure2). Moreover, combined treatment with DZNep and TrichostatineA (TSA) increased *Hace1* expression in the Ramos and Raji cell lines more than treatment with DZNep alone, suggesting synergy between DZNep and TSA (Figure 3).

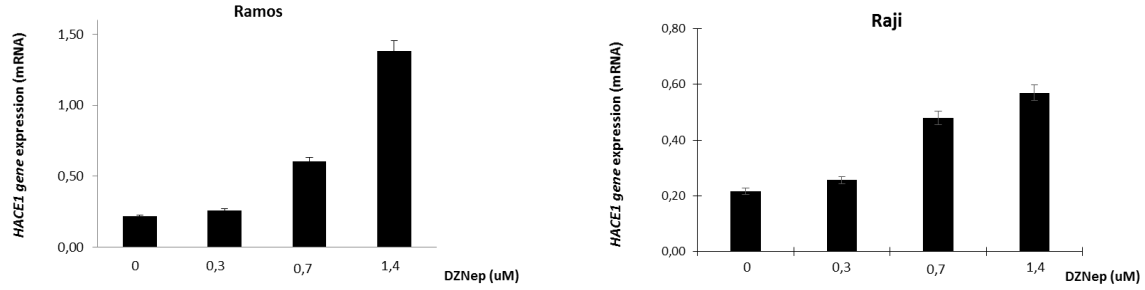


Figure 2. DZNep treatment promotes HACE1expression in B-cell lymphoma.
The expression of *HACE1* mRNA was measured by RT-PCR after treatment with DZNep. Cells were treated with the same concentrations of DMSO as controls. The fold changes of mRNA concentrations in the DZNep groups relative to the control groups were determined by the comparative Ct method. Data are reported as the mean ± the standard deviation derived from three independent experiments.

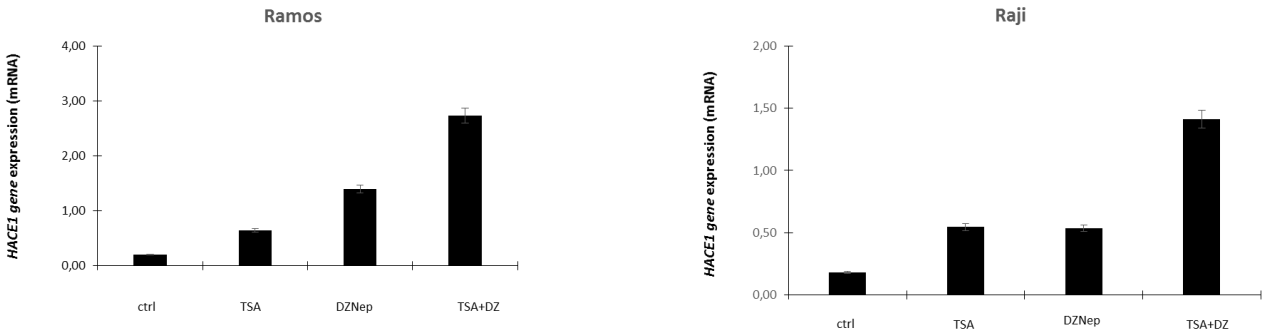


Figure 3. Differential induction of *HACE1* expression by epigenetic treatments.
Ramos and Raji cells were treated with DMSO (control) or the indicated drug regimens. Differences in *HACE1*mRNA levels were measured by RT-PCR. *TBP* gene expression was used as an internal control. Columns represent the average HACE1 mRNA levels of four independent experiments. Bars represent the SE of the mean.

The *HACE1* promoter has high levels of the inactivating histone mark H3K27me3 at the CPG88 island but not the CpG177 island in Ramos and Raji cell lines.

We investigated whether the *HACE1* gene is down-regulated in Ramos and Raji cells by trimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27me3). We performed ChIP assays on Ramos and Raji cell lines using antibodies for the repressive histone marks H3K27me3 and H3K9me2. We used normal human Lymphocyte B cells as a negative control for histone methylation. The CpG88 island of the *HACE1* promoter region in Ramos cells was enriched for both H3K27me3 and H3K9me2 relative to B lymphocytes, whereas the CpG177 island was less highly enriched for H3K27me3 (Figure 4). Raji cells gave a similar profile. Bouzelfen *et al*[2] previously showed that DNA at CpG88 is poorly methylated whereas DNA at CpG177 is hypermethylated. They proposed an inverse correlation between DNA methylation and H3K27me3 levels in the *HACE1* promoter region.

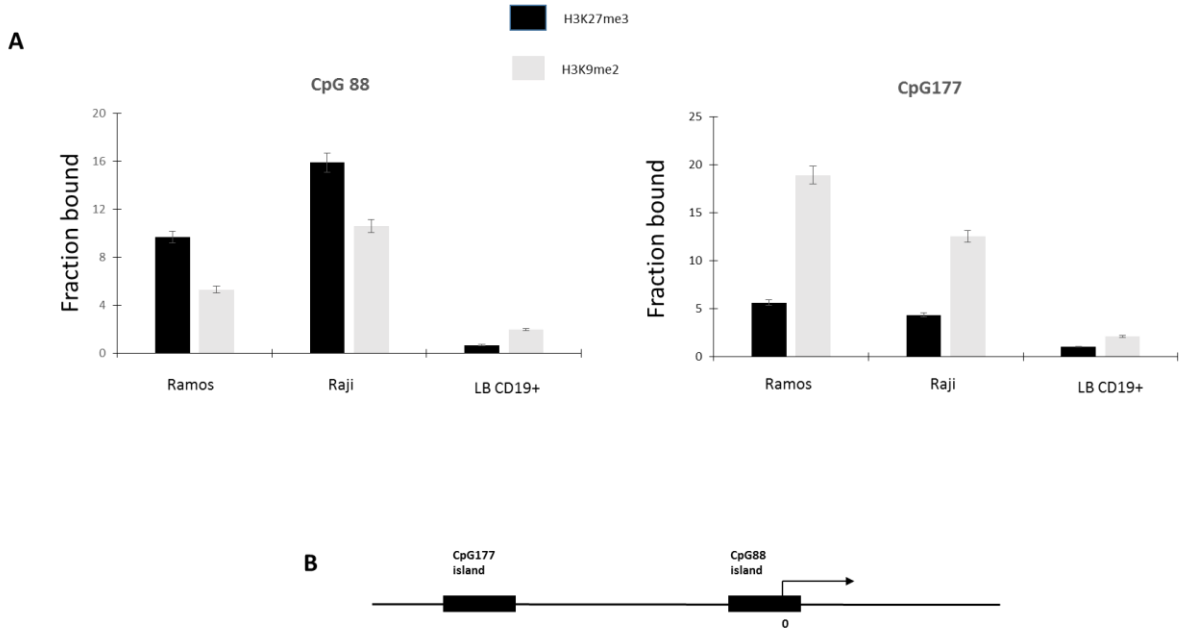


Figure 4. Ramos and Raji cells are enriched for histone H3K27me3 at CpG88 relative to B lymphocytes. A. Quantitative ChIP assay of methylated histone (H3K9me2 and H3K27me3) in the *HACE1* promoter (CpG88 and CpG177). **B.** Two regions of the *HACE1* promoter were targeted by ChIP assay.

DZNep reduces H3K27me3 levels at CpG88 and H3K9me2 levels at CpG88 and CpG177.

We treated Ramos and Raji cells with DZNep and performed a ChIP assay to confirm that the suppressive histone mark, H3K27me3, regulates *HACE1* expression. DZNep is a global inhibitor of histone methylation, and H3K9 and H3K27 methylation are marks of gene silencing. We thus examined the changes of histone methylation, H3K9me2 and H3K27me3, in the promoter regions of *HACE1* at CpG88 and CpG177. We performed chromatin immunoprecipitation with chromatin from DZNep-treated Ramos and Raji cells using antibodies against H3K27me3 and H3K9me2. We observed lower levels of H3K27me3 in the *HACE1* promoter in the DZNep treated cells only at CpG88 associated with increased *HACE1* expression (Figure 5). The level of H3K9me2 in the promoter region of *HACE1* following DZNep treatment was significantly lower than that observed in B lymphocytes. Both CpGs (CpG177 and CpG88) had significantly lower levels of H3K9me2 following DZNep treatment (Figure 5). It was previously shown that a high level of CpG methylation does not correlate

with a high level of H3K27me3 or the action of DZNep[4]. Pyrosequencing of the CpG islands in the promoter of *HACE1* showed that the CpG177 island was very highly methylated, whereas the level of methylation of the CpG88 island was extremely low[2]. The differential DNA methylation of the promoter regions of the *HACE1* gene may account for the CpG island-dependent differences in DZNep-induced decreases of H3K27me3 levels.

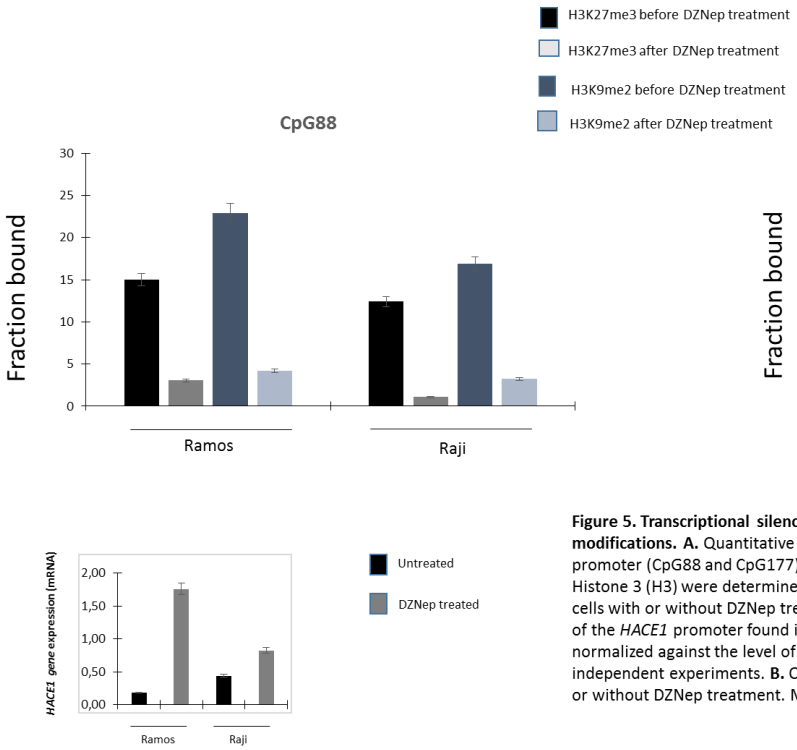


Figure 5. Transcriptional silencing of *HACE1* in Ramos and Raji cells is associated with histone modifications. A. Quantitative ChIP assay of histone modifications (H3K27me3 and H3K9me2) of the promoter (CpG88 and CpG177) induced byDZNep treatment. The levels of methylated (repressive mark) Histone 3 (H3) were determined using antibodies directed against methylated H3 in Ramos and Raji cells with or without DZNep treatment. The fraction bound represents the fold difference in the amount of the *HACE1* promoter found in the methylated-histone antibody immunoprecipitated (IP) DNA normalized against the level of nonspecific IgG antibody IP DNA. The data are representative of three independent experiments. **B.** Quantitative analysis of HACE1 mRNA levels in Ramos and Raji cells with or without DZNep treatment. Mann-Whitney test *p-value* < 0.0001

Overexpression of *EZH2* in B lymphoma cell lines relative to that of normal B cells from peripheral blood.

We performed QRT-PCR to analyze the expression level of the *EZH2* gene in proliferating Ramos and Raji cells relative to that in normal non-proliferating B cells from peripheral blood to investigate whether EZH2 could be responsible of H3K27me3 overexpression. We observed a significantly higher level of *EZH2* expression in Ramos and Raji cell lines relative to normal B cells from peripheral blood in accordance with previous studies[9,10] (Figure 6). This increase

was more pronounced in the Ramos cell line. These results are also in agreement with previous reports on mantle cell lymphoma (MCL) and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cases, suggesting that *EZH2* overexpression in B-cell lymphomas may be a sign of clinical aggressiveness[11].

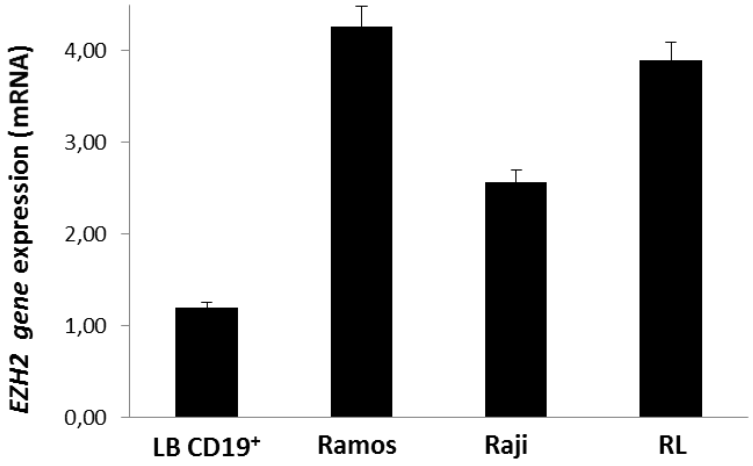


Figure 6. Overexpression of EZH2 in B-lymphoma cell lines.
Quantification of EZH2 mRNA in B-lymphoma cell lines and control lymphocytes from peripheral blood. EZH2 mRNA expression was determined by qRT-PCR. B cells from healthy blood donors isolated from peripheral blood mononuclear cells were used as control. Data are represented by the mean ± SD of three independent experiments.

Discussion

DZNep inhibits the proliferation of various types of human cancer cells including lung cancer and chondrosarcoma cells[4,6,7,8]. Here, we showed that the promoter region of the *HACE1* gene in B lymphoma cell lines (Ramos and Raji) is highly enriched for the histone methylation mark, H3K9me2, at the CpG88 and CpG177 islands, whereas H3K27me3 is only highly enriched at CpG88. Treatment with DZNep significantly reduced the level of H3K9me2 at both the CpG88 and CpG177 islands and H3K27me3 at CPG88. This study is also the first to report that DZNep can increase the expression of *HACE1* through modification of the histone methylation status.

DZNep was first reported to modulate H3K27 methylation through the depletion of the PRC2 complex[3], with later studies showing that it is a global regulator of histone methylation[6,7]. The reduction of H3K9me2 levels following DZNep treatment reported in this study is in agreement with the results of a recent study showing that DZNep also inhibits also the activity of SETDB1, an H3K9 HMTase, thus reducing H3K9 methylation[3]. Bouzelfen et *al* (Leukemia research 2016) reported a high level of DNA methylation in CpG island 177, whereas the level was very low in CpG88. DNA hypermethylation is a mechanism of epigenetic regulation to inactivate downstream genes of mammalian cells[12,11,13]. The high level of CpG methylation observed in CpG177 of the *HACE1*promoter indicates that it was probably silenced by DNA hypermethylation during leukemogenesis, but we previously showed that the level of DNA methylation does not correlate with the level of *HACE1* gene expression. Moreover, in this study, we found a high level of H3K27me3 and H3K9me2 at CpG88, whereas the level of DNA methylation was low. CpG88 may play a more important role than CpG177 in the regulation of *HACE1* expression as DZNep treatment led to an increase in *HACE1* expression via decreased levels of H3K27me3 and H3K9me2. We did not assess the level of CpG

methylation in the *HACE1* gene promoter after DZNep treatment. However, an earlier finding showed that DZNep had little or no impact on DNA methylation and could not reactivate the genes that had been silenced by the hypermethylation of CpG islands[4].

This study has several limitations. It focused only on H3K27 and H3K9 methylation and only two human B-lymphoma cell lines were used in this study. More detailed and extensive examination of histone methylation after DZNep treatment would help to more clearly understand how DZNep modulates the expression of *HACE1*. A broader range of B-lymphoma cell lines, and potentially primary patient samples, also need to be tested to further confirm the inhibitory effect of DZNep on human B cell lymphoma through *HACE1* reexpression.

Reference list

1. Wang Z., Zang C., Rosenfeld J.A., Schones D.E. *et al.* (2008) "Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome". *Nat Genet*, 40: 897-903.

2. Bouzelfen A., Alcantra M., Kora H., Picquenot J.M., *et al.* (2016) "*HACE1* is a putative tumor suppressor gene in B-cell lymphomagenesis and is down-regulated by both deletion and epigenetic alterations". *Leuk Res*, 45: 90-100.

3. Tan J., Yang X., Zhuang L., Jiang X. *et al.* (2007) "Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells". *Gene Dev*, 21: 1050-1063.

4. Miranda T.B., Cortez C.C., Yoo C.B., Liang G., *et al.* (2009) "DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation". *Mol Cancer Ther*, 8: 1579-1588.

5. FiskusW., Wang Y., Sreekumar A., Buckley K.M. *et al.* (2009) "Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells". *Blood*, 114: 2733-2743.

6. Zhou Y., Bi C., Cheong L.L., Mahara S. *et al.* (2011) "The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML". *Blood*, 118: 2830-2839.

7. Lee J.K. & Kim K.C. (2013) "DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDBI H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells". *Biochem Biophys Res Commun*, 438: 647-652.

8. Girard N., Bazille C., Lhuissier E., Benateau H *et al.* (2014) "3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells". *Plos One*, 9:e98176.

9. Baylin S.B., Belinsky S.A. & Herman J.G. (2000) "Aberrant methylation of gene promoters in cancer – concepts, misconcepts, and promise". *J Natl Cancer Inst*, 92: 1460-1461.

10. Jones P.A. & Baylin S.B. (2007) "The epigenomics of cancer". *Cell*, 128: 683-692.

11. Herman J.G. & Baylin I. (2003) "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation". *N Engl J Med*, 349: 2042-2054.

12. Baylin S.B. & Herman J.G. (2000) "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics". *Trends Genet*, 16: 168-174.

13. Zhu W.G., Srinivasan K., Dai Z., Duan W. *et al.* (2003) "Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21 (Cip1) promoter". *Mol Cell Biol*, 23: 4056-4065.

Bibliographie

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136,** E359-386 (2015).
2. Epidémiologie des cancers - Les chiffres du cancer en France | Institut National Du Cancer. Available at: http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers. (Accessed: 8th August 2016)
3. GHO | By category | WORLD - By cause. *WHO* Available at: http://apps.who.int/gho/data/node.main.CODWORLD?lang=en. (Accessed: 8th August 2016)
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100,** 57–70 (2000).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).
6. 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).
7. Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* **21,** 233–240 (2009).
8. Chen, Y.-L., Chen, S.-H., Wang, J.-Y. & Yang, B.-C. Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171,** 1183–1191 (2003).
9. Graf, M. R., Prins, R. M. & Merchant, R. E. IL-6 secretion by a rat T9 glioma clone induces a neutrophil-dependent antitumor response with resultant cellular, antiglioma immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166,** 121–129 (2001).
10. Gregory, A. D. & Houghton, A. M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* **71,** 2411–2416 (2011).
11. Munitz, A. & Levi-Schaffer, F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* **59,** 268–275 (2004).
12. Darcy, P. K., Neeson, P., Yong, C. S. M. & Kershaw, M. H. Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **27,** 46–52 (2014).
13. Simson, L. *et al.* Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178,** 4222–4229 (2007).
14. Cerny-Reiterer, S. *et al.* Identification of basophils as a major source of hepatocyte growth factor in chronic myeloid leukemia: a novel mechanism of BCR-ABL1-independent disease progression. *Neoplasia N. Y. N* **14,** 572–584 (2012).
15. Yasuda, H. *et al.* Chronic myelogenous leukemia with mild basophilia as the predominant manifestation at presentation. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* **50,** 501–502 (2011).
16. Seledtsov, V. I., Goncharov, A. G. & Seledtsova, G. V. Clinically feasible approaches to potentiating cancer cell-based immunotherapies. *Hum. Vaccines Immunother.* **11,** 851–869 (2015).
17. Herberman, R. B., Nunn, M. E. & Lavrin, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* **16,** 216–229 (1975).
18. Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. 'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5,** 112–117 (1975).
19. Coca, S. *et al.* The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* **79,** 2320–2328 (1997).

20. Taketomi, A. *et al.* Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma: a new prognostic indicator after hepatectomy. *Cancer* **83,** 58–63 (1998).
21. Ishigami, S. *et al.* Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* **88,** 577–583 (2000).
22. Takanami, I., Takeuchi, K. & Giga, M. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **121,** 1058–1063 (2001).
23. Cózar, J. M. *et al.* Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **54,** 858–866 (2005).
24. Hsia, J.-Y. *et al.* Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Chang Gung Med. J.* **28,** 335–340 (2005).
25. Villegas, F. R. *et al.* Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **35,** 23–28 (2002).
26. Sznurkowski, J. J., Zawrocki, A. & Biernat, W. Subtypes of cytotoxic lymphocytes and natural killer cells infiltrating cancer nests correlate with prognosis in patients with vulvar squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **63,** 297–303 (2014).
27. Malygin, A. M., Meri, S. & Timonen, T. Regulation of natural killer cell activity by transforming growth factor-beta and prostaglandin E2. *Scand. J. Immunol.* **37,** 71–76 (1993).
28. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N. & Papamichail, M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **24,** 74–85 (2006).
29. Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P. & Adema, G. J. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* **138,** 105–115 (2013).
30. Metelitsa, L. S., Weinberg, K. I., Emanuel, P. D. & Seeger, R. C. Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. *Leukemia* **17,** 1068–1077 (2003).
31. Molling, J. W. *et al.* Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25,** 862–868 (2007).
32. Ni, C. *et al.* Thymosin alpha1 enhanced cytotoxicity of iNKT cells against colon cancer via upregulating CD1d expression. *Cancer Lett.* **356,** 579–588 (2015).
33. Ko, H.-J. *et al.* Immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells can be converted into immunogenic APCs with the help of activated NKT cells: an alternative cell-based antitumor vaccine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182,** 1818–1828 (2009).
34. Crane, C. A. *et al.* TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro-Oncol.* **12,** 7–13 (2010).
35. Zocchi, M. R. & Poggi, A. Role of gammadelta T lymphocytes in tumor defense. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **9,** 2588–2604 (2004).
36. Braza, M. S., Klein, B., Fiol, G. & Rossi, J.-F. γδ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica* **96,** 400–407 (2011).
37. Burjanadzé, M. *et al.* In vitro expansion of gamma delta T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **139,** 206–216 (2007).

38. Saitoh, A. *et al.* Anti-tumor cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells of patients with myeloma and lymphoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **25,** 137–147 (2008).
39. Kobayashi, H. *et al.* Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **56,** 469–476 (2007).
40. Corvaisier, M. *et al.* V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175,** 5481–5488 (2005).
41. Greten, T. F., Manns, M. P. & Korangy, F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int. Immunopharmacol.* **11,** 802–807 (2011).
42. Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* **12,** 253–268 (2012).
43. Doyle, A. G. *et al.* Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* **24,** 1441–1445 (1994).
44. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164,** 6166–6173 (2000).
45. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41,** 14–20 (2014).
46. Fridlender, Z. G. & Albelda, S. M. Modifying tumor-associated macrophages: An important adjunct to immunotherapy. *Oncoimmunology* **2,** e26620 (2013).
47. Komohara, Y., Jinushi, M. & Takeya, M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci.* **105,** 1–8 (2014).
48. Lahmar, Q. *et al.* Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* **1865,** 23–34 (2016).
49. Edin, S., Wikberg, M. L., Oldenborg, P.-A. & Palmqvist, R. Macrophages: Good guys in colorectal cancer. *Oncoimmunology* **2,** e23038 (2013).
50. Edin, S. *et al.* The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PLoS ONE* **7,** (2012).
51. Kang, J.-C., Chen, J.-S., Lee, C.-H., Chang, J.-J. & Shieh, Y.-S. Intratumoral macrophage counts correlate with tumor progression in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* **102,** 242–248 (2010).
52. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137,** 1142–1162 (1973).
53. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Ralph M. Steinman 1943-2011. *Cell* **147,** 1216–1217 (2011).
54. Rowley, D. A. & Fitch, F. W. The road to the discovery of dendritic cells, a tribute to Ralph Steinman. *Cell. Immunol.* **273,** 95–98 (2012).
55. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392,** 245–252 (1998).
56. Qi, H., Egen, J. G., Huang, A. Y. C. & Germain, R. N. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* **312,** 1672–1676 (2006).
57. Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392,** 86–89 (1998).
58. Huang, A. Y. *et al.* Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* **264,** 961–965 (1994).

59. Diamond, M. S. *et al.* Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* **208,** 1989–2003 (2011).
60. Fuertes, M. B. *et al.* Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **208,** 2005–2016 (2011).
61. Cai, X.-Y. *et al.* Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **132,** 293–301 (2006).
62. Daud, A. I. *et al.* Phenotypic and functional analysis of dendritic cells and clinical outcome in patients with high-risk melanoma treated with adjuvant granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26,** 3235–3241 (2008).
63. Furihata, M. *et al.* Prognostic significance of simultaneous infiltration of HLA-DR-positive dendritic cells and tumor infiltrating lymphocytes into human esophageal carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* **169,** 187–195 (1993).
64. Honig, A., Schaller, N., Dietl, J., Backe, J. & Kammerer, U. S100 as an immunohistochemically-detected marker with prognostic significance in endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* **25,** 1747–1753 (2005).
65. Ishigami, S. *et al.* Clinical implications of intratumoral dendritic cell infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **10,** 1237–1240 (2003).
66. Bahlis, N. J. *et al.* CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood* **109,** 5002–5010 (2007).
67. Curiel, T. J. *et al.* Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res.* **64,** 5535–5538 (2004).
68. Ishigami, S. *et al.* Prognostic value of CD208-positive cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **59,** 389–395 (2010).
69. Jensen, T. O. *et al.* Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* **118,** 2476–2485 (2012).
70. Sandel, M. H. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11,** 2576–2582 (2005).
71. Treilleux, I. *et al.* Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10,** 7466–7474 (2004).
72. Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M. & Wentzensen, N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **58,** 1535–1544 (2009).
73. Lund, F. E. & Randall, T. D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 236–247 (2010).
74. Fremd, C., Schuetz, F., Sohn, C., Beckhove, P. & Domschke, C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology* **2,** e25443 (2013).
75. Mosmann, T. R. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17,** 138–146 (1996).
76. Agarwal, N., Padmanabh, S. & Vogelzang, N. J. Development of novel immune interventions for prostate cancer. *Clin. Genitourin. Cancer* **10,** 84–92 (2012).
77. Muranski, P. & Restifo, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121,** 2402–2414 (2013).
78. Zou, W. & Restifo, N. P. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 248–256 (2010).
79. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Yu, D. & MacLennan, I. C. M. Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **34,** 335–368 (2016).

80. Amé-Thomas, P. *et al.* Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia* **26,** 1053–1063 (2012).
81. Cha, Z. *et al.* Association of peripheral CD4+ CXCR5+ T cells with chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **34,** 3579–3585 (2013).
82. Ahearne, M. J. *et al.* 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. *Br. J. Haematol.* **162,** 360–370 (2013).
83. Gu-Trantien, C. *et al.* $CD4^+$ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* **123,** 2873–2892 (2013).
84. Bindea, G. *et al.* Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* **39,** 782–795 (2013).
85. Adeegbe, D. O. & Nishikawa, H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front. Immunol.* **4,** 190 (2013).
86. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299,** 1057–1061 (2003).
87. Kryczek, I. *et al.* FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res.* **69,** 3995–4000 (2009).
88. von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* **6,** 338–344 (2005).
89. Ichihara, F. *et al.* Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9,** 4404–4408 (2003).
90. Liyanage, U. K. *et al.* Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *J. Immunol.* **169,** 2756–2761 (2002).
91. Okita, R., Saeki, T., Takashima, S., Yamaguchi, Y. & Toge, T. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **14,** 1269–1273 (2005).
92. Clarke, S. L. *et al.* CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PloS One* **1,** e129 (2006).
93. Ling, K. L. *et al.* Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun.* **7,** 7 (2007).
94. Loddenkemper, C. *et al.* In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J. Transl. Med.* **4,** 52 (2006).
95. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10,** 942–949 (2004).
96. Chaput, N. *et al.* Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* **58,** 520–529 (2009).
97. 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).
98. Frey, D. M. *et al.* High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* **126,** 2635–2643 (2010).
99. Nosho, K. *et al.* Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J. Pathol.* **222,** 350–366 (2010).

100. Salama, P. *et al.* Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27,** 186–192 (2009).
101. Tougeron, D. *et al.* Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers. *PloS One* **8,** e61001 (2013).
102. Uyttenhove, C., Maryanski, J. & Boon, T. Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J. Exp. Med.* **157,** 1040–1052 (1983).
103. Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450,** 903–907 (2007).
104. Pagès, F. *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **353,** 2654–2666 (2005).
105. Galon, J. *et al.* Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* **232,** 199–209 (2014).
106. Koelzer, V. H. *et al.* CD8/CD45RO T-cell infiltration in endoscopic biopsies of colorectal cancer predicts nodal metastasis and survival. *J. Transl. Med.* **12,** 81 (2014).
107. Mahmoud, S. M. A. *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29,** 1949–1955 (2011).
108. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 18538–18543 (2005).
109. Apetoh, L. *et al.* Consensus nomenclature for CD8(+) T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology* **4,** e998538 (2015).
110. Barry, M. & Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* **2,** 401–409 (2002).
111. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393,** 480–483 (1998).
112. Masson, D. & Tschopp, J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* **49,** 679–685 (1987).
113. Pasternack, M. S., Verret, C. R., Liu, M. A. & Eisen, H. N. Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. *Nature* **322,** 740–743 (1986).
114. Street, S. E., Cretney, E. & Smyth, M. J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* **97,** 192–197 (2001).
115. Street, S. E. A., Trapani, J. A., MacGregor, D. & Smyth, M. J. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J. Exp. Med.* **196,** 129–134 (2002).
116. Cieri, N. *et al.* IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* **121,** 573–584 (2013).
117. Gattinoni, L. & Restifo, N. P. Moving T memory stem cells to the clinic. *Blood* **121,** 567–568 (2013).
118. Wang, R.-F. CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Hum. Immunol.* **69,** 811–814 (2008).
119. Wei, S. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **65,** 5020–5026 (2005).
120. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285,** 221–227 (1999).

121. Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11,** 823–836 (2011).
122. Kurts, C., Robinson, B. W. S. & Knolle, P. A. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 403–414 (2010).
123. Crotzer, V. L. & Blum, J. S. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology* **131,** 9–17 (2010).
124. Stevanović, S. & Schild, H. Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin. Immunol.* **11,** 375–384 (1999).
125. Rammensee, H. G., Falk, K. & Rötzschke, O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11,** 213–244 (1993).
126. Bjorkman, P. J. *et al.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329,** 506–512 (1987).
127. Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351,** 290–296 (1991).
128. Engelhard, V. H., Bullock, T. N. J., Colella, T. A., Sheasley, S. L. & Mullins, D. W. Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* **188,** 136–146 (2002).
129. Hunt, D. F. *et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255,** 1261–1263 (1992).
130. Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* **353,** 321–325 (1991).
131. Heath, W. R. *et al.* Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* **199,** 9–26 (2004).
132. Hammer, G. E., Kanaseki, T. & Shastri, N. The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity* **26,** 397–406 (2007).
133. Rock, K. L. *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78,** 761–771 (1994).
134. Reits, E. A., Vos, J. C., Grommé, M. & Neefjes, J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* **404,** 774–778 (2000).
135. Sijts, E. J. a. M. & Kloetzel, P. M. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68,** 1491–1502 (2011).
136. Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* **78,** 477–513 (2009).
137. Groettrup, M., Kirk, C. J. & Basler, M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 73–78 (2010).
138. 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).
139. Ortiz-Navarrete, V. *et al.* Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* **353,** 662–664 (1991).
140. Kelly, A. *et al.* Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* **353,** 667–668 (1991).
141. Glynne, R. *et al.* A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* **353,** 357–360 (1991).

142. Brown, M. G., Driscoll, J. & Monaco, J. J. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* **353,** 355–357 (1991).
143. Nandi, D., Jiang, H. & Monaco, J. J. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156,** 2361–2364 (1996).
144. Groettrup, M. *et al.* A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* **26,** 863–869 (1996).
145. Khan, S. *et al.* Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167,** 6859–6868 (2001).
146. Akiyama, K. *et al.* cDNA cloning and interferon gamma down-regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science* **265,** 1231–1234 (1994).
147. Kloetzel, P. M. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2,** 179–187 (2001).
148. Unno, M. *et al.* The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 A resolution. *Struct. Lond. Engl. 1993* **10,** 609–618 (2002).
149. Gaczynska, M., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* **365,** 264–267 (1993).
150. Nussbaum, A. K. *et al.* Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 12504–12509 (1998).
151. Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. & Goldberg, A. L. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **274,** 3363–3371 (1999).
152. Beninga, J., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **273,** 18734–18742 (1998).
153. Stoltze, L. *et al.* Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* **1,** 413–418 (2000).
154. Reits, E. *et al.* A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* **20,** 495–506 (2004).
155. Koopmann, J. O., Post, M., Neefjes, J. J., Hämmerling, G. J. & Momburg, F. Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* **26,** 1720–1728 (1996).
156. Momburg, F., Roelse, J., Hämmerling, G. J. & Neefjes, J. J. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J. Exp. Med.* **179,** 1613–1623 (1994).
157. van Endert, P. M. *et al.* The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.* **182,** 1883–1895 (1995).
158. Peaper, D. R., Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. *EMBO J.* **24,** 3613–3623 (2005).
159. Dick, T. P., Bangia, N., Peaper, D. R. & Cresswell, P. Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity* **16,** 87–98 (2002).
160. Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat. Immunol.* **8,** 873–881 (2007).

161. Saric, T. *et al.* An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3,** 1169–1176 (2002).
162. Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11,** 823–836 (2011).
163. Roche, P. A. & Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **15,** 203–216 (2015).
164. Roche, P. A. & Cresswell, P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345,** 615–618 (1990).
165. Busch, R. *et al.* Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol. Rev.* **207,** 242–260 (2005).
166. Denzin, L. K., Fallas, J. L., Prendes, M. & Yi, W. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol. Rev.* **207,** 279–292 (2005).
167. Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M. & Rock, K. L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21,** 155–165 (2004).
168. Adiko, A. C., Babdor, J., Gutiérrez-Martínez, E., Guermonprez, P. & Saveanu, L. Intracellular Transport Routes for MHC I and Their Relevance for Antigen Cross-Presentation. *Front. Immunol.* **6,** 335 (2015).
169. Cantrell, D. Signaling in lymphocyte activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7,** (2015).
170. Daniels, M. A. & Teixeiro, E. TCR Signaling in T Cell Memory. *Front. Immunol.* **6,** 617 (2015).
171. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21,** 305–334 (2003).
172. Newton, K. & Dixit, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4,** (2012).
173. Capece, D., Verzella, D., Fischietti, M., Zazzeroni, F. & Alesse, E. Targeting costimulatory molecules to improve antitumor immunity. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012,** 926321 (2012).
174. Driessens, G., Kline, J. & Gajewski, T. F. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol. Rev.* **229,** 126–144 (2009).
175. Rochman, Y., Spolski, R. & Leonard, W. J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* **9,** 480–490 (2009).
176. Lenardo, M. J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353,** 858–861 (1991).
177. D'Souza, W. N. & Lefrançois, L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171,** 5727–5735 (2003).
178. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22,** 329–360 (2004).
179. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13,** 1–27 (1970).
180. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3,** 991–998 (2002).
181. Kaplan, D. H. *et al.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 7556–7561 (1998).
182. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313,** 1960–1964 (2006).

183. Loeb, L. A., Loeb, K. R. & Anderson, J. P. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 776–781 (2003).
184. Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14,** 135–146 (2014).
185. Beatty, G. L. & Gladney, W. L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21,** 687–692 (2015).
186. Campoli, M. & Ferrone, S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene* **27,** 5869–5885 (2008).
187. Kitamura, H. *et al.* Effect of human leukocyte antigen class I expression of tumor cells on outcome of intravesical instillation of bacillus calmette-guerin immunotherapy for bladder cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12,** 4641–4644 (2006).
188. Shehata, M. *et al.* Human leukocyte antigen class I expression is an independent prognostic factor in advanced ovarian cancer resistant to first-line platinum chemotherapy. *Br. J. Cancer* **101,** 1321–1328 (2009).
189. Sconocchia, G. *et al.* HLA class II antigen expression in colorectal carcinoma tumors as a favorable prognostic marker. *Neoplasia N. Y. N* **16,** 31–42 (2014).
190. Taube, J. M. *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci. Transl. Med.* **4,** 127ra37 (2012).
191. Taube, J. M. *et al.* Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20,** 5064–5074 (2014).
192. Liu, Y. & Cao, X. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. *J. Mol. Med.* **94,** 509–522 (2015).
193. von Boehmer, H. & Daniel, C. Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12,** 51–63 (2013).
194. Lind, M. H. *et al.* Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappaB inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 4972–4977 (2004).
195. Lin, E. Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A. V. & Pollard, J. W. The Macrophage Growth Factor CSF-1 in Mammary Gland Development and Tumor Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7,** 147–162
196. Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2,** 1096–1103 (1996).
197. Vinay, D. S. *et al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.* **35 Suppl,** S185-198 (2015).
198. 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).
199. 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).
200. Hoos, A. *et al.* Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin. Oncol.* **37,** 533–546 (2010).
201. Characiejus, D. Cancer immunotherapy: Benefit and harm? *Oncoimmunology* **1,** 232–233 (2012).
202. Lesterhuis, W. J., Haanen, J. B. A. G. & Punt, C. J. A. Cancer immunotherapy--revisited. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10,** 591–600 (2011).

203. 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).
204. Ehrlich, P. & Bolduan, C. *Collected studies on immunity*. (New York, J. Wiley & sons; [etc., etc.], 1906).
205. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256,** 495–497 (1975).
206. Alkan, S. S. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nat. Rev. Immunol.* **4,** 153–156 (2004).
207. Vacchelli, E. *et al.* Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* **2,** e22789 (2013).
208. Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 317–327 (2010).
209. Cavallo, F., Calogero, R. A. & Forni, G. Are oncoantigens suitable targets for anti-tumour therapy? *Nat. Rev. Cancer* **7,** 707–713 (2007).
210. Kaplan-Lefko, P. J. *et al.* Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol. Ther.* **9,** 618–631 (2010).
211. Weiner, L. M. *et al.* Dose and schedule study of panitumumab monotherapy in patients with advanced solid malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14,** 502–508 (2008).
212. Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.-P. & Novotny, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3,** 391–400 (2004).
213. Michielsen, A. J., Ryan, E. J. & O'Sullivan, J. N. Dendritic cell inhibition correlates with survival of colorectal cancer patients on bevacizumab treatment. *Oncoimmunology* **1,** 1445–1447 (2012).
214. Ming Lim, C., Stephenson, R., Salazar, A. M. & Ferris, R. L. TLR3 agonists improve the immunostimulatory potential of cetuximab against EGFR(+) head and neck cancer cells. *Oncoimmunology* **2,** e24677 (2013).
215. Vacchelli, E. *et al.* Trial watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies for oncological indications. *OncoImmunology* **4,** e985940 (2015).
216. Galluzzi, L. *et al.* Trial Watch: Adoptive cell transfer immunotherapy. *Oncoimmunology* **1,** 306–315 (2012).
217. Yang, X. D. *et al.* Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res.* **59,** 1236–1243 (1999).
218. Hecht, J. R. *et al.* Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Cancer* **110,** 980–988 (2007).
219. Van Cutsem, E. *et al.* Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25,** 1658–1664 (2007).
220. Hurvitz, S. A. *et al.* A phase II trial of docetaxel with bevacizumab as first-line therapy for HER2-negative metastatic breast cancer (TORI B01). *Clin. Breast Cancer* **10,** 307–312 (2010).
221. Sandler, A. *et al.* Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **355,** 2542–2550 (2006).
222. Galluzzi, L. *et al.* Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* **5,** 12472–12508 (2014).

223. Hughes, B. Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? *Nat. Rev. Drug Discov.* **9,** 665–667 (2010).
224. Leal, M. *et al.* Antibody-drug conjugates: an emerging modality for the treatment of cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1321,** 41–54 (2014).
225. Jones, B. Haematological cancer: rituximab maintenance improves the outcome of elderly patients with FL. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10,** 607 (2013).
226. Winiarska, M., Glodkowska-Mrowka, E., Bil, J. & Golab, J. Molecular mechanisms of the antitumor effects of anti-CD20 antibodies. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **16,** 277–306 (2011).
227. Choi, B. D., Pastan, I., Bigner, D. D. & Sampson, J. H. A novel bispecific antibody recruits T cells to eradicate tumors in the 'immunologically privileged' central nervous system. *Oncoimmunology* **2,** e23639 (2013).
228. Hoffman, L. M. & Gore, L. Blinatumomab, a Bi-Specific Anti-CD19/CD3 BiTE(®) Antibody for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: Perspectives and Current Pediatric Applications. *Front. Oncol.* **4,** 63 (2014).
229. Topp, M. S. *et al.* Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood* **120,** 5185–5187 (2012).
230. Walter, R. B. Biting back: BiTE antibodies as a promising therapy for acute myeloid leukemia. *Expert Rev. Hematol.* **7,** 317–319 (2014).
231. Vacchelli, E. *et al.* Trial Watch-Immunostimulation with cytokines in cancer therapy. *Oncoimmunology* **5,** e1115942 (2016).
232. Ahmadzadeh, M. & Rosenberg, S. A. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* **107,** 2409–2414 (2006).
233. Sim, G. C. *et al.* IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **124,** 99–110 (2014).
234. Aranda, F. *et al.* Trial Watch: Immunostimulatory monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* **3,** e27297 (2014).
235. Walker, L. S. K. & Sansom, D. M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* **11,** 852–863 (2011).
236. Munir, S., Andersen, G. H., Svane, I. M. & Andersen, M. H. The immune checkpoint regulator PD-L1 is a specific target for naturally occurring CD4(+) T cells. *Oncoimmunology* **2,** e23991 (2013).
237. Withers, D. R. *et al.* OX40 and CD30 signals in CD4(+) T-cell effector and memory function: a distinct role for lymphoid tissue inducer cells in maintaining CD4(+) T-cell memory but not effector function. *Immunol. Rev.* **244,** 134–148 (2011).
238. Shevach, E. M. & Stephens, G. L. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat. Rev. Immunol.* **6,** 613–618 (2006).
239. Pickup, M., Novitskiy, S. & Moses, H. L. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **13,** 788–799 (2013).
240. Bloy, N. *et al.* Trial watch: Dendritic cell-based anticancer therapy. *Oncoimmunology* **3,** e963424 (2014).
241. Senovilla, L. *et al.* Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* **1,** 1323–1343 (2012).
242. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* **12,** 265–277 (2012).
243. Okada, H. *et al.* Induction of CD8+ T-Cell Responses Against Novel Glioma–Associated Antigen Peptides and Clinical Activity by Vaccinations With α-Type 1 Polarized Dendritic Cells and Polyinosinic-Polycytidylic Acid Stabilized by Lysine and

Carboxymethylcellulose in Patients With Recurrent Malignant Glioma. *J. Clin. Oncol.* **29,** 330–336 (2011).
244. Antonia, S. J. *et al.* Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12,** 878–887 (2006).
245. Blalock, L. T. *et al.* Human dendritic cells adenovirally-engineered to express three defined tumor antigens promote broad adaptive and innate immunity. *Oncoimmunology* **1,** 287–357 (2012).
246. Kandalaft, L. E. *et al.* Autologous lysate-pulsed dendritic cell vaccination followed by adoptive transfer of vaccine-primed ex vivo co-stimulated T cells in recurrent ovarian cancer. *Oncoimmunology* **2,** e22664 (2013).
247. Boczkowski, D., Nair, S. K., Nam, J. H., Lyerly, H. K. & Gilboa, E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res.* **60,** 1028–1034 (2000).
248. Yoo, S., Choi, S. Y., You, D. & Kim, C.-S. New drugs in prostate cancer. *Prostate Int.* **4,** 37–42 (2016).
249. Pol, J. *et al.* Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines. *Oncoimmunology* **4,** e974411 (2015).
250. Melief, C. J. M. & van der Burg, S. H. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat. Rev. Cancer* **8,** 351–360 (2008).
251. Zom, G. G. *et al.* Efficient induction of antitumor immunity by synthetic toll-like receptor ligand-peptide conjugates. *Cancer Immunol. Res.* **2,** 756–764 (2014).
252. Pol, J. *et al.* Trial Watch: DNA vaccines for cancer therapy. *Oncoimmunology* **3,** e28185 (2014).
253. U S Food and Drug Administration Home Page. Available at: http://www.fda.gov/. (Accessed: 4th September 2016)
254. Offringa, R. Antigen choice in adoptive T-cell therapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **21,** 190–199 (2009).
255. Rapoport, A. P. *et al.* Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer. *Nat. Med.* **11,** 1230–1237 (2005).
256. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26,** 5233–5239 (2008).
257. Rosenberg, S. A. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer--what clinicians need to know. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8,** 577–585 (2011).
258. Yun, Y. S., Hargrove, M. E. & Ting, C. C. In vivo antitumor activity of anti-CD3-induced activated killer cells. *Cancer Res.* **49,** 4770–4774 (1989).
259. Bouquié, R. *et al.* A fast and efficient HLA multimer-based sorting procedure that induces little apoptosis to isolate clinical grade human tumor specific T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **58,** 553–566 (2009).
260. Aranda, F. *et al.* Trial Watch: Adoptive cell transfer for anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **3,** e28344 (2014).
261. Johnson, L. A. *et al.* Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* **114,** 535–546 (2009).
262. Parkhurst, M. R. *et al.* T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19,** 620–626 (2011).
263. Sadelain, M., Rivière, I. & Brentjens, R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat. Rev. Cancer* **3,** 35–45 (2003).

264. Spear, P., Barber, A. & Sentman, C. L. Collaboration of chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells and host T cells for optimal elimination of established ovarian tumors. *Oncoimmunology* **2,** e23564 (2013).
265. Pule, M. A. *et al.* Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat. Med.* **14,** 1264–1270 (2008).
266. Beatty, G. L. *et al.* Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol. Res.* **2,** 112–120 (2014).
267. Kalos, M. *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* **3,** 95ra73 (2011).
268. Brentjens, R. J. *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* **118,** 4817–4828 (2011).
269. Kochenderfer, J. N. & Rosenberg, S. A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10,** 267–276 (2013).
270. Gattinoni, L. *et al.* Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.* **115,** 1616–1626 (2005).
271. Gattinoni, L. *et al.* A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* **17,** 1290–1297 (2011).
272. Steenblock, E. R., Wrzesinski, S. H., Flavell, R. A. & Fahmy, T. M. Antigen presentation on artificial acellular substrates: modular systems for flexible, adaptable immunotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9,** 451–464 (2009).
273. Turtle, C. J. & Riddell, S. R. Artificial antigen presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer J. Sudbury Mass* **16,** 374–381 (2010).
274. Kim, J. V., Latouche, J.-B., Rivière, I. & Sadelain, M. The ABCs of artificial antigen presentation. *Nat. Biotechnol.* **22,** 403–410 (2004).
275. Mitchell, M. S. *et al.* Phase I trial of adoptive immunotherapy with cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20,** 1075–1086 (2002).
276. Schoenberger, S. P. *et al.* Efficient direct priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte in vivo by an engineered APC. *Cancer Res.* **58,** 3094–3100 (1998).
277. Latouche, J. B. & Sadelain, M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat. Biotechnol.* **18,** 405–409 (2000).
278. Anichini, A. *et al.* Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J. Exp. Med.* **177,** 989–998 (1993).
279. Coulie, P. G. *et al.* A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **180,** 35–42 (1994).
280. Kawakami, Y. *et al.* Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91,** 3515–3519 (1994).
281. Kawakami, Y. *et al.* Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **180,** 347–352 (1994).

282. Romero, P. *et al.* Cytolytic T lymphocyte recognition of the immunodominant HLA-A*0201-restricted Melan-A/MART-1 antigenic peptide in melanoma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **159,** 2366–2374 (1997).
283. Valmori, D. *et al.* Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **160,** 1750–1758 (1998).
284. Correale, P. *et al.* In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *J. Natl. Cancer Inst.* **89,** 293–300 (1997).
285. Jaramillo, A. *et al.* Identification of HLA-A3-restricted CD8+ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer. *Int. J. Cancer* **102,** 499–506 (2002).
286. Tsang, K. Y. *et al.* Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* **87,** 982–990 (1995).
287. Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T. & Ioannides, C. G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* **181,** 2109–2117 (1995).
288. Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L. & Nadler, L. M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **10,** 673–679 (1999).
289. De Smet, C. *et al.* Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics* **39,** 121–129 (1994).
290. De Smet, C., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V. & Boon, T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell. Biol.* **19,** 7327–7335 (1999).
291. van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254,** 1643–1647 (1991).
292. Van den Eynde, B. *et al.* A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.* **182,** 689–698 (1995).
293. Chen, Y. T. *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 1914–1918 (1997).
294. zur Hausen, H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* **49,** 4677–4681 (1989).
295. Stich, M. *et al.* 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) treatment downregulates the HPV E6 and E7 oncogene expression and blocks neoplastic growth of HPV-associated cancer cells. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10631
296. von Knebel Doeberitz, M., Oltersdorf, T., Schwarz, E. & Gissmann, L. Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* **48,** 3780–3786 (1988).
297. Sarwari, N. M., Khoury, J. D. & Hernandez, C. M. R. Chronic Epstein Barr virus infection leading to classical Hodgkin lymphoma. *BMC Hematol.* **16,** 19 (2016).
298. Wu, B. *et al.* Epstein-Barr virus-negative diffuse large B cell lymphoma with aberrant expression of CD3 and other T cell-associated antigens: report of three cases with a review of the literature. *Ann. Hematol.* 1–13 (2016). doi:10.1007/s00277-016-2749-0
299. Wölfel, T. *et al.* A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269,** 1281–1284 (1995).

300. Saeterdal, I. *et al.* Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 13255–13260 (2001).
301. Clark, R. E. *et al.* Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood* **98,** 2887–2893 (2001).
302. Coulie, P. G. *et al.* A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92,** 7976–7980 (1995).
303. Kawakami, Y. *et al.* Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor-infiltrating T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166,** 2871–2877 (2001).
304. Vigneron, N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed Res. Int.* **2015,** 948501 (2015).
305. Vigneron, N., Ooms, A., Morel, S., Degiovanni, G. & Van Den Eynde, B. J. Identification of a new peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Cancer Immun.* **2,** 9 (2002).
306. Huang, J. *et al.* T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172,** 6057–6064 (2004).
307. Linnebacher, M. *et al.* Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int. J. Cancer* **93,** 6–11 (2001).
308. Cheever, M. A. *et al.* The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Am. Assoc. Cancer Res.* **15,** 5323–5337 (2009).
309. Traversari, C. *et al.* A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* **176,** 1453–1457 (1992).
310. Boël, P. *et al.* BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* **2,** 167–175 (1995).
311. Brichard, V. *et al.* The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **178,** 489–495 (1993).
312. Bakker, A. B. *et al.* Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **179,** 1005–1009 (1994).
313. Boer, J. M. *et al.* Identification and Classification of Differentially Expressed Genes in Renal Cell Carcinoma by Expression Profiling on a Global Human 31,500-Element cDNA Array. *Genome Res.* **11,** 1861–1870 (2001).
314. Inoue, M. *et al.* Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *Int. J. Cancer* **127,** 1393–1403 (2010).
315. Weinschenk, T. *et al.* Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* **62,** 5818–5827 (2002).
316. Rammensee, H.-G. & Singh-Jasuja, H. HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach. *Expert Rev. Vaccines* **12,** 1211–1217 (2013).
317. Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A. & Irlin, I. S. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* **1,** 174–180 (1963).
318. Gold, P. & Freedman, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* **122,** 467–481 (1965).
319. Pfreundschuh, M. *et al.* Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75,** 5122–5126 (1978).

320. Shiku, H., Takahashi, T. & Oettgen, H. F. Cell surface antigens of human malignant melanoma. II. Serological typing with immune adherence assays and definition of two new surface antigens. *J. Exp. Med.* **144,** 873–881 (1976).
321. Ueda, R. *et al.* Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing. *J. Exp. Med.* **150,** 564–579 (1979).
322. Old, L. J. Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res.* **41,** 361–375 (1981).
323. Neville, A. M. Detection of tumor antigens with monoclonal antibodies: immunopathology and immunodiagnosis. *Curr. Opin. Immunol.* **3,** 674–678 (1991).
324. Sell, S. Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum. Pathol.* **21,** 1003–1019 (1990).
325. Masson, P., Pålsson, B. & Andrén-Sandberg, A. Cancer-associated tumour markers CA 19-9 and CA-50 in patients with pancreatic cancer with special reference to the Lewis blood cell status. *Br. J. Cancer* **62,** 118–121 (1990).
326. Bast, R. C. *et al.* A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **309,** 883–887 (1983).
327. Li, G., Zhang, X. Y., Fan, D. M. & Hu, J. L. Detection of antigen-specific immune complexes in sera of gastric and esophageal cancer patients. *Chin. Med. J. (Engl.)* **107,** 189–191 (1994).
328. Sahin, U. *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92,** 11810–11813 (1995).
329. Garifulin, O. M. *et al.* Application of serex-analysis for identification of human colon cancer antigens. *Exp. Oncol.* **37,** 173–180 (2015).
330. Stevanovic, S. Antigen processing is predictable: From genes to T cell epitopes. *Transpl. Immunol.* **14,** 171–174 (2005).
331. 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).
332. Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351,** 290–296 (1991).
333. Rammensee, H. G., Friede, T. & Stevanoviíc, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* **41,** 178–228 (1995).
334. Nussbaum, A. K., Kuttler, C., Hadeler, K. P., Rammensee, H. G. & Schild, H. PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* **53,** 87–94 (2001).
335. Keşmir, C., Nussbaum, A. K., Schild, H., Detours, V. & Brunak, S. Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng.* **15,** 287–296 (2002).
336. Holzhütter, H. G., Frömmel, C. & Kloetzel, P. M. A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. *J. Mol. Biol.* **286,** 1251–1265 (1999).
337. Sturniolo, T. *et al.* Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat. Biotechnol.* **17,** 555–561 (1999).
338. Prilliman, K. *et al.* Large-scale production of class I bound peptides: assigning a signature to HLA-B*1501. *Immunogenetics* **45,** 379–385 (1997).
339. Scull, K. E. *et al.* Secreted HLA recapitulates the immunopeptidome and allows in-depth coverage of HLA A*02:01 ligands. *Mol. Immunol.* **51,** 136–142 (2012).

340. Storkus, W. J., Zeh, H. J., Salter, R. D. & Lotze, M. T. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J. Immunother. Emphas. Tumor Immunol. Off. J. Soc. Biol. Ther.* **14,** 94–103 (1993).
341. Castelli, C. *et al.* Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181,** 363–368 (1995).
342. Parham, P. Purification of immunologically active HLA-A and -B antigens by a series of monoclonal antibody columns. *J. Biol. Chem.* **254,** 8709–8712 (1979).
343. Neumann, A. *et al.* Identification of HLA ligands and T-cell epitopes for immunotherapy of lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **62,** 1485–1497 (2013).
344. Schirle, M. *et al.* Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.* **30,** 2216–2225 (2000).
345. Seeger, F. H. *et al.* The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* **49,** 571–576 (1999).
346. Meyer, V. S. *et al.* Identification of natural MHC class II presented phosphopeptides and tumor-derived MHC class I phospholigands. *J. Proteome Res.* **8,** 3666–3674 (2009).
347. Barnstable, C. J. *et al.* Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* **14,** 9–20 (1978).
348. Kowalewski, D. J. & Stevanović, S. Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **960,** 145–157 (2013).
349. Goldman, J. M., Hibbin, J., Kearney, L., Orchard, K. & Th'ng, K. H. HLA-DR monoclonal antibodies inhibit the proliferation of normal and chronic granulocytic leukaemia myeloid progenitor cells. *Br. J. Haematol.* **52,** 411–420 (1982).
350. Shackelford, D. A., Lampson, L. A. & Strominger, J. L. Separation of three class II antigens from a homozygous human B cell line. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **130,** 289–296 (1983).
351. Edman, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* **22,** 475 (1949).
352. Stevanović, S. & Jung, G. Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal. Biochem.* **212,** 212–220 (1993).
353. Hunt, D. F. *et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255,** 1261–1263 (1992).
354. Chicz, R. M. *et al.* Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* **358,** 764–768 (1992).
355. Seliger, B. *et al.* Identification and characterization of human leukocyte antigen class I ligands in renal cell carcinoma cells. *Proteomics* **11,** 2528–2541 (2011).
356. Stickel, J. S. *et al.* HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **58,** 1407–1417 (2009).
357. Dutoit, V. *et al.* Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain J. Neurol.* **135,** 1042–1054 (2012).
358. Neidert, M. C. *et al.* Natural HLA class I ligands from glioblastoma: extending the options for immunotherapy. *J. Neurooncol.* **111,** 285–294 (2013).
359. Berlin, C. *et al.* Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia* **29,** 647–659 (2015).
360. Kowalewski, D. J. *et al.* HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112,** E166-175 (2015).

361. Walz, S. *et al.* The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy. *Blood* **126,** 1203–1213 (2015).
362. Löffler, M. W. *et al.* Personalized peptide vaccine induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2016.06.027
363. Gygi, S. P. *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17,** 994–999 (1999).
364. Lemmel, C. *et al.* Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.* **22,** 450–454 (2004).
365. Ross, P. L. *et al.* Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **3,** 1154–1169 (2004).
366. Ong, S.-E. *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **1,** 376–386 (2002).
367. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **25,** 16–27 (2016).
368. Cress, R. D., Morris, C., Ellison, G. L. & Goodman, M. T. Secular changes in colorectal cancer incidence by subsite, stage at diagnosis, and race/ethnicity, 1992-2001. *Cancer* **107,** 1142–1152 (2006).
369. Colditz, G. A. *et al.* Harvard report on cancer prevention volume 4: Harvard Cancer Risk Index. Risk Index Working Group, Harvard Center for Cancer Prevention. *Cancer Causes Control CCC* **11,** 477–488 (2000).
370. Wei, E. K. *et al.* Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int. J. Cancer* **108,** 433–442 (2004).
371. Edwards, B. K. *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* **116,** 544–573 (2010).
372. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **11,** 35–41 (2009).
373. Guinney, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **21,** 1350–1356 (2015).
374. Grady, W. M. & Carethers, J. M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* **135,** 1079–1099 (2008).
375. Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R. & Coppedè, F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011,** 792362 (2011).
376. Perea, J., Lomas, M. & Hidalgo, M. Molecular basis of colorrectal cancer: towards an individualized management? *Rev. Esp. Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Esp. Patol. Dig.* **103,** 29–35 (2011).
377. Erstad, D. J., Tumusiime, G. & Cusack, J. C. Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer: Implications for the Clinical Surgeon. *Ann. Surg. Oncol.* **22,** 3433–3450 (2015).
378. Sameer, A. S., Nissar, S. & Fatima, K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* **23,** 246–257 (2014).

379. Silva, F. C. C. da, Valentin, M. D., Ferreira, F. de O., Carraro, D. M. & Rossi, B. M. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *São Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* **127,** 46–51 (2009).
380. Zhang, C.-M. *et al.* Role of Deficient Mismatch Repair in the Personalized Management of Colorectal Cancer. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **13,** (2016).
381. Kawakami, H., Zaanan, A. & Sinicrope, F. A. Implications of mismatch repair-deficient status on management of early stage colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* **6,** 676–684 (2015).
382. Ligtenberg, M. J. L. *et al.* Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* **41,** 112–117 (2009).
383. Quiroga, D., Lyerly, H. K. & Morse, M. A. Deficient Mismatch Repair and the Role of Immunotherapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* **17,** 41 (2016).
384. Timmermann, B. *et al.* Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis. *PloS One* **5,** e15661 (2010).
385. Mori, Y. *et al.* Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res.* **61,** 6046–6049 (2001).
386. 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).
387. 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).
388. Segal, N. H. *et al.* Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res.* **68,** 889–892 (2008).
389. Ishikawa, T. *et al.* Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* **63,** 5564–5572 (2003).
390. Dolcetti, R. *et al.* High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am. J. Pathol.* **154,** 1805–1813 (1999).
391. Schwitalle, Y. *et al.* Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* **134,** 988–997 (2008).
392. 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).
393. Saeterdal, I., Gjertsen, M. K., Straten, P., Eriksen, J. A. & Gaudernack, G. A TGF betaRII frameshift-mutation-derived CTL epitope recognised by HLA-A2-restricted CD8+ T cells. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **50,** 469–476 (2001).
394. Ripberger, E., Linnebacher, M., Schwitalle, Y., Gebert, J. & von Knebel Doeberitz, M. Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. *J. Clin. Immunol.* **23,** 415–423 (2003).
395. Markowitz, S. *et al.* Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268,** 1336–1338 (1995).
396. Rampino, N. *et al.* Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275,** 967–969 (1997).

397. Huang, J. *et al.* APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93,** 9049–9054 (1996).
398. Banerjea, A. *et al.* Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol. Cancer* **3,** 21 (2004).
399. Quinn, E., Hawkins, N., Yip, Y. L., Suter, C. & Ward, R. CD103+ intraepithelial lymphocytes--a unique population in microsatellite unstable sporadic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **39,** 469–475 (2003).
400. Phillips, S. M. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *Br. J. Surg.* **91,** 469–475 (2004).
401. Di Giorgio, A., Botti, C., Tocchi, A., Mingazzini, P. & Flammia, M. The influence of tumor lymphocytic infiltration on long term survival of surgically treated colorectal cancer patients. *Int. Surg.* **77,** 256–260 (1992).
402. Duval, A. & Hamelin, R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* **62,** 2447–2454 (2002).
403. Michel, S. *et al.* High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br. J. Cancer* **99,** 1867–1873 (2008).
404. Suzuki, H. *et al.* Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **59,** 653–661 (2010).
405. Bauer, K. *et al.* T cell responses against microsatellite instability-induced frameshift peptides and influence of regulatory T cells in colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **62,** 27–37 (2013).
406. Le Gouvello, S. *et al.* High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut* **57,** 772–779 (2008).
407. Watson, P. *et al.* Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer* **83,** 259–266 (1998).
408. Llosa, N. J. *et al.* The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* **5,** 43–51 (2015).
409. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372,** 2509–2520 (2015).
410. Heemskerk, B., Kvistborg, P. & Schumacher, T. N. M. The cancer antigenome. *EMBO J.* **32,** 194–203 (2013).
411. Schumacher, T. N., Kesmir, C. & van Buuren, M. M. Biomarkers in cancer immunotherapy. *Cancer Cell* **27,** 12–14 (2015).
412. 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).
413. 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).
414. 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).
415. 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).

416. 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).
417. 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).
418. Dutoit, V. *et al.* Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain J. Neurol.* **135,** 1042–1054 (2012).
419. Valmori, D. *et al.* Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multipeptide melanoma vaccine. *Cancer Immun.* **3,** 15 (2003).
420. Abdel-Wahab, Z. *et al.* Induction of anti-melanoma CTL response using DC transfected with mutated mRNA encoding full-length Melan-A/MART-1 antigen with an A27L amino acid substitution. *Cell. Immunol.* **224,** 86–97 (2003).
421. Abdel-Wahab, Z. *et al.* Cotransfection of DC with TLR4 and MART-1 RNA induces MART-1-specific responses. *J. Surg. Res.* **124,** 264–273 (2005).
422. Labarrière, N. *et al.* PBMC are as good a source of tumor-reactive T lymphocytes as TIL after selection by Melan-A/A2 multimer immunomagnetic sorting. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **57,** 185–195 (2008).
423. Romero, P. *et al.* Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol. Rev.* **188,** 81–96 (2002).
424. 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).
425. Derré, L. *et al.* A Novel Population of Human Melanoma-Specific CD8 T Cells Recognizes Melan-AMART-1 Immunodominant Nonapeptide but Not the Corresponding Decapeptide. *J. Immunol.* **179,** 7635–7645 (2007).
426. Valitutti, S., Müller, S., Cella, M., Padovan, E. & Lanzavecchia, A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375,** 148–151 (1995).
427. Kamata, Y. *et al.* Identification of HLA class I-binding peptides derived from unique cancer-associated proteins by mass spectrometric analysis. *Anticancer Res.* **33,** 1853–1859 (2013).
428. Gloger, A., Ritz, D., Fugmann, T. & Neri, D. Mass spectrometric analysis of the HLA class I peptidome of melanoma cell lines as a promising tool for the identification of putative tumor-associated HLA epitopes. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **65,** 1377–1393 (2016).
429. Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Biomolecules* **4,** 994–1025 (2014).
430. Hanada, K.-I., Yewdell, J. W. & Yang, J. C. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* **427,** 252–256 (2004).
431. Michaux, A. *et al.* 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192,** 1962–1971 (2014).
432. Liepe, J. *et al.* A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science* **354,** 354–358 (2016).
433. Ghavami, S. *et al.* Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* **46,** 497–510 (2009).
434. 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).

435. 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).
436. 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).
437. 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).
438. 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).
439. 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).
440. Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138,** 2073–2087.e3 (2010).
441. Ishikawa, T. *et al.* Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* **63,** 5564–5572 (2003).
442. Latouche, J. B. & Sadelain, M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat. Biotechnol.* **18,** 405–409 (2000).
443. 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).
444. Soung, Y. H. *et al.* Mutational analysis of caspase 1, 4, and 5 genes in common human cancers. *Hum. Pathol.* **39,** 895–900 (2008).
445. 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).
446. 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).
447. 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).
448. 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).
449. 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).
450. Schneider, J., Brichard, V., Boon, T., Meyer zum Büschenfelde, K. H. & Wölfel, T. Overlapping peptides of melanocyte differentiation antigen Melan-A/MART-1 recognized by autologous cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B45.1 and HLA-A2.1. *Int. J. Cancer* **75,** 451–458 (1998).
451. Christinck, E. R., Luscher, M. A., Barber, B. H. & Williams, D. B. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* **352,** 67–70 (1991).
452. Harding, C. V. & Unanue, E. R. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* **346,** 574–576 (1990).

453. Demotz, S., Grey, H. M. & Sette, A. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* **249,** 1028–1030 (1990).
454. Moreau-Aubry, A. *et al.* A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma. *J. Exp. Med.* **191,** 1617–1624 (2000).
455. Guilloux, Y. *et al.* A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med.* **183,** 1173–1183 (1996).
456. Van Den Eynde, B. J. *et al.* A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J. Exp. Med.* **190,** 1793–1800 (1999).
457. Vanderperre, B. *et al.* Direct detection of alternative open reading frames translation products in human significantly expands the proteome. *PloS One* **8,** e70698 (2013).
458. Barnetson, R. *et al.* Mutations associated with microsatellite unstable colorectal carcinomas exhibit widespread intratumoral heterogeneity. *Genes. Chromosomes Cancer* **29,** 130–136 (2000).
459. Wang, D. *et al.* Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by the tumor microenvironment promotes tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **31,** 3670–3680 (2011).
460. Apcher, S. *et al.* Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108,** 11572–11577 (2011).
461. Linnebacher, M. *et al.* Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int. J. Cancer* **93,** 6–11 (2001).