



N°: 81360

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE **FRANCHE-COMTE**

COMTE

PREPAREE À l'EFS BFC, INSERM, UMR 1098,

Interaction Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génétique,

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale Environnements Santé Bourgogne Franche-Comté

Doctorat en science de la vie, spécialité immunologie

Par

VRECKO Sindy

Étude des réponses lymphocytaires T spécifiques de néoantigènes tumoraux après immunomodulations induites par des chimiothérapies

Thèse présentée et soutenue à « Besançon », le « 17 Janvier 2018 »

Composition du Jury :

Pr, DE CARVALHO BITTENCOURT Marcello	PU-PH, UMR7365	Président
Pr, DE CARVALHO BITTENCOURT Marcello	PU-PH, UMR7365	Rapporteur
Dr, LATOUCHE Jean-Baptiste	MCU, UMR1245	Rapporteur
Dr, GODET Yann	MCU, UMR1098	Directeur de thèse
Pr, ADOTEVI Olivier	PU-PH, UMR1098	Co-directeur de thèse

« Tout ce que je sais, c'est que je ne sais rien, tandis que les autres croient savoir ce qu'ils ne savent pas »

Socrate

« Guérissons notre planète pour nous guérir »

David Servan - Schreiber

Remerciements

Parce que cette thèse n'est pas seulement le résultat d'un long travail, parce que c'est un ensemble de personne qui m'a soutenu à différents moments et jusqu'à la fin de cette épreuve, je tiens tous à vous adresser ma gratitude.

En premier lieu, je remercie Monsieur le Professeur Philippe SAAS de m'avoir accueilli dans son unité de recherche, ainsi que mes directeurs de thèse, Monsieur le Docteur Yann Godet et Monsieur le Professeur Olivier Adotévi, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse et participer à de nombreux projets. Vos conseils, ainsi que votre vision de la recherche m'ont été précieux et vos me suivre tout au long de ma carrière.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Monsieur le Professeur Marcelo De Carvalho Bittencourt et Monsieur le Docteur Jean-Baptiste Latouche, pour avoir consacré leur temps à la lecture, l'expertise et la critique de ce travail.

Je remercie également la région de Bourgogne - Franche-Comté pour avoir financé ce projet de thèse.

Je remercie aussi l'ensemble des chercheurs de l'unité qui ont pu m'apporter leurs conseils sur cette recherche, notamment Messieurs les Professeurs Christophe Borg, Christophe Ferrand, Madame le Docteur Marina Descamps et Monsieur le Docteur Sylvain Perruche.

Parce que les conseils ne sont pas uniquement donnés par les séniors, je remercie aussi tous mes collègues, qui m'ont apporté leur aide tout au long de ces années ; les co-bureaux, Jérémy alias Zeus, l'homme sans qui sait tout faire, chanter, danser, ..., Laurie S. alias bébé Laurie petite chef dans l'âme, Emile alias Emilïloche ma comparse d'organisation des évènements pour le labo. Et surtout, Patricia, l'héroïne de ses livres, petite, toute petite dame mais quelle grande âme. Merci Pat, pour tous ces moments au L2, allant des conseils manip' jusqu'à la comparaison de nos ventre, j'espère que nous aurons encore bien d'autres séances piscine avec nos maillots jumeaux !

Merci aux actuelles doctorantes, Elodie LMJ my sweety, merci pour ta bonne humeur et ton soutien toutes ces années, depuis ton Master 1, je suis fière d'avoir travaillé avec toi. Laurie R. merci pour tes conseils et toutes ces discussions dans les moments de crises ou non. Chrystel,

mon choux, comment te remercier pour tous ces instants passés avec toi ! Merci pour tout, ta musique (oui visiblement les Gipsy Kings ne passaient vraiment pas au L2 pour Pat'), ce concert au Bataclan, ta bonne humeur, ton soutien et merci encore pour tous ces moments de grimpette, qui d'ailleurs m'ont permis d'apprendre ta technique de changement de pieds, tel un petit chat se tortillant sur le mur !

Je remercie aussi les anciens doctorants, Clémentine et Elodie BR, les inséparables qui m'ont apporté leur soutien dès mon Master 2 et donné de précieux conseils jusqu'à la dernière minute pour la reliure du manuscrit et la préparation de ma soutenance. Je n'oublie pas de remercier aussi tous les anciens du labo, Vincent Z. qui m'a fait rire avec ses jolies photos de poupée mi-Jap, quelle beauté ! Laurent merci pour ce don de manips que tu m'as fait lors de ma première année de thèse et tous ces conseils à distance, Jeanne merci pour ton humour (« il ne peut plus rien nous ar-ri-ver d'af-freux maint-enant ») et tes conseils manips, mais aussi Adam, Kamal, Laure, Christelle, Marie et Célia.

Merci aussi à Idir pour ton soutien dès le Master 2, mais aussi Aymeric, Jean-Marie, Francis, aux filles des plateformes, Thierry (alias TG), Hanane, Cécile, Anaïs, Kiki, Mimi, Pacou, Laurie de la comm', aux infirmières de l'EFS et les animaliers (Hervé, Chanchan, Anna, Dom).

Merci aux copains de fac. Ma dernière binôme, mon donuts multicolore, Djo que de beaux moments passés avec toi, merci pour tous ces fou rires, ta Mazda avec en fond sonore Bella de Maitre Gims à fond. Clémence, tant de souvenirs un peu fou où que tu sois aujourd'hui en vadrouille. Merci aussi à Dany, Jean de dieu, JC, Flavien, Gwendal, Cél1, Caro,...

Un immense merci à Madame le Professeur Christiane Mougin, sans qui cette thèse n'aurait jamais fini. Merci pour ton soutien tout au long de ces années, de la Fac en Médecine à aujourd'hui, en passant par ce séjour dans ton laboratoire, et quel stage ! Merveilleuse première expérience à tes cotés. Merci pour tes conseils et tes remarques toujours bienveillantes et sincères. Merci Christiane pour cet après-midi répétition de soutenance qui restera gravée comme l'un des moments les plus agréables et merci aussi pour avoir remué tout Besançon deux jours avant cette soutenance... J'admire ta force. Merci pour ton implication et ton engagement.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur David Guenat pour ces heures passées à la rédaction de cet article, pour ces discussions tout au long de ces trois années et tes conseils avisés. Merci aussi à Hugues pour ton aide dans les analyses des données de bioinfos. Merci pour tout. Je remercie aussi mes anciens professeurs avec qui j'ai la chance de travailler désormais, pour leur soutient tout au long de ces années d'études, leur bonne humeur et leurs conseils si précieux, Messieurs les Professeurs Regis Delage-Mourroux, Michael Boyer Guittaut, et Messieurs les docteurs Eric Hervouet, Gilles Despouy, Jean Radom et surtout Mesdames les Docteurs Anick Fraichard et Pascale Adami. Merci pour tout, vos enseignements, votre soutient, je vous admire ! Je tiens aussi à remercier Valérie (promis je ne te coincerai plus dans les portes), Camille (arrête de me faire une mauvaise réputation auprès des étudiants !) et Marine (la fondeuse de folie), merci à vous pour tous ces fous rires et ceux à venir.

Une grosse pensée aux étudiants que j'ai pu suivre ces dernières années (surtout les L3BBCP promo 2017-18), pendant ma thèse et surtout ceux avec qui je travaille cette année. Vous avez été ma bouffée d'oxygène, surtout ces derniers mois, merci pour votre gentillesse, votre volonté, votre humour et surtout pour me permettre d'apprendre ce beau métier avec vous.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer lors des évènements de l'Expérimentarium, une jolie famille de science vulgarisée. Une autre belle activité qui m'a permis de reprendre mon souffle durant les moments difficiles. Merci à toi Jérémy, pour ton soutient, ton humour et malgré tous tes oublis (bizarrement, toujours mes feuilles de présentation...à croire que tu t'acharnes...) merci pour ton efficacité, sans toi cette thèse aurait été bien tristounette et monotone ! Merci à Manu qui a bossé dure le soir et le week-end pour fabriquer ces splendides puzzles de cellules, merci à Claire, Elodie, Coralie, Jeanne-Antide, Boris, ... et merci à Lionel sans qui cette aventure n'existerait pas ! Merci aux copains de l'Expé et du MT180s, merci à ces hommes, ces femmes, ces génies ! Alors merci à vous les bisontins, dijonais-es, Margaux, Julie, Anne, Mathilde, Quentin... les marseillais Benjamin, Eric, Quentin,... et tous les autres.

En second lieu, je tiens à remercier tous mes amis. Sans vous je n'aurai jamais pu initier ni même terminer ce travail. Je pense à vous mes connasses, Omi, la belle Andalouse aidée par les animaux de la forêt, Paulo, le beau Guatémaltèque pour qui les langues étrangères sont un jeu d'enfant et Leila, ma jolie co-bureau complétement déjantée qui ne cesse de m'apprendre de nouvelles prises de jujitsu à base de « Pouloulou ». Merci à vous trois sans qui toute cette aventure n'aurait pas été si ensoleillée. Je remercie aussi mes amis du comité d'organisation du FJC, de belles amitiés sont nées, Thibault, le Roméo des Maths à bicyclette, merci pour ton soutient et toute cette belle énergie que tu transmets, Quentine, l'homme aux bras mort du Doubs et son agenda de poche toujours plein, merci pour ton sourire et ta bonne humeur, mais aussi Stéphane (ta chambre est réservée où que je sois pour ton tour du monde !), Jérôme, Marie B., Koceila, ... Merci pour ces moments formidables du FJC, ceux qui ont suivis et qui vont suivre !

Je tiens à remercier aussi mes amis du tir sans qui ces dernières années auraient été bien moins joyeuses. Tout d'abord Anne Dup', dans quel paragraphe te remercier... difficile question puisque tu as partagé de nombreux moments de ma vie ces dernières années, au labo et en dehors... Alors un grand merci pour m'avoir fait découvrir ce beau sport qu'est le tir, puis tous tes conseils manip, mais aussi toutes ces heures de correction de ce manuscrit (d'ailleurs mes remerciements doivent être bourrés de fautes !). Coach Michel... tout est dit en un mot, coach de vie, coach de tir,... merci pour tout ! Un grand merci aussi à Mesut pour ta bonne humeur et ton sourire. Merci à mes petits de l'équipe de m'avoir accepté si facilement et ce malgré mon grand âge. Alors merci à bébé Lilian, à la toute petite Jeanne, à Forest le photographe, à Marina la fofolle. Merci aussi à Jean, Sylvain, la belle Marie (et ce moment jacuzzi magique !), Benoit et les autres.

Merci à mes amis d'enfance, de jeunesse, de fac,... Les copains, merci pour tous ces moments partagés ensemble, bons comme très bons et plus difficiles aussi, Fred aux gros sourcils, Sebou au gros nez, Anthony le beau voyageur, Thibault et son sens si particulier de la mécanique, dim l'artiste, Yannou le pro du popcorn caram-grillé en grains. Et surtout Didier, merci pour tous ces moments partagés ensemble, tous ces échanges et ces discussions parfois très agitées, j'admire que tu reprennes tes études, Bravo ! Merci les copains. Maintenant, le gang des licornes... Hélène, merci pour tout, pour me supporter et soutenir depuis maintenant... je n'ose pas le dire... 19 et bientôt 20 ans... et oui... l'année de la trentaine... enfin plus que quelques mois pour toi ! Anna, si j'avais dû choisir une sœur, elle serait ta copie conforme. Merci pour tout ce rose et ces paillettes que tu mets dans ma vie. Merci pour ton soutient à distance, tous ces appels, ces messages, cartes et cadeaux (sandwich frigot et sapin de noël gonflable). Docteur Valenza, quel Médecin vous allez faire... ! Marion T. merci pour ton aide précieuse, depuis cette rencontre (un peu incongrue) et jusqu'à la dernière minute pour ma soutenance ! Sans toi l'amphi réservé pour ma soutenance n'aurait certainement jamais été ouvert ! Merci pour tous ces moments partagés ensemble, même les retours des Euroks sont mémorables avec toi. Merci à Marion B. (alias ion ion) c'est un tel plaisir de te voir à chaque fois et ton accent ... une douce mélodie (oui c'est tout de même des remerciements !).

Merci aux nouveaux copains de Poligny, j'aurai toujours un doute sur ces guirlandes de slips... pile à mon arrivée... Merci pour tous ces rires, ces moments de détente, votre bonne humeur et votre soutient. Le plus ancien, Dudu, merci pour ... tous ces bleus sur mes bras... (je ne me vengerai jamais assez) et merci aussi pour tous ces moments de décompression, Océane cœur de l'océan, merci pour toutes ces confections « Home Made » et tous ceux à venir. Merci à Mich l'un de mes repères dans cette nouvelle ville ! Alors merci pour tous ces moments, les restos, le pub et aussi les séances de grimpe sur notre nouvelle voie ! Merci aux autres pour votre bonne humeur communicative, Léa et Declau (quelle superbe idée ce livre « Home Made » !!!), JB, Charlène, Babane, Anissa, Suzanne,...

Mais aussi merci la famille Vacelet en passant par les parents, oncles, tantes, cousins et cousines (beaucoup trop nombreux pour que je les cite), Adé, Manu et Franck, Max et Patou, merci pour ces moments qui m'ont permis de relâcher la pression.

Je tiens aussi à remercier la famille mariez, vous m'avez tant apporté et appris pendant ces 3 années, de la couture, à la cuisine, en passant par la navigation, les chicons, le nord, les blagues de clafougnette et l'accent des ch'tis, mais aussi et surtout, les charades et pire.. les charades à tiroirs... Alors merci pour tous ces fabuleux moments, inoubliables, partagés ensemble, Sylvard et Gery, la jolie Suzanne, la belle Loulou, aux garçons Pôl et Flo. Victor, mon Faton, merci pour ton soutient tout au long de ces années émotionnellement chargées, tous ces mots toujours très justes, ton réconfort et merci pour ton analyse toujours pertinente. Merci pour tout ce que tu m'as appris et tout ce qu'on a partagé. Merci de m'avoir permis de grandir à tes côtés, tu auras toujours une place particulière.

Merci à la famille Pelletier Villequin qui m'a toujours soutenu, toutes ces années, Odile et Daniel, mes deuxièmes parents, Lucie, toujours présente, une véritable grande sœur, merci à Lucas pour ton jolie sourire et tous ces coups de main, ton sourire et ta joie de vivre, mais aussi flo, JC, sans oublier le petit Milo (que j'ai déjà bien exploité pour frotter les murs de mon appart !), Pascal, Sylvain et Anne-Marie. Je pense très souvent à vous tous.

Enfin, je remercie ma famille et en particulier ma maman que je ne remercierai jamais assez, mais je vais quand même essayer. Alors merci pour ton soutient indéfectible, pour tous ces sacrifices, merci pour ton aide, tes conseils et ton amour, je t'aime et t'admire tant. Merci aussi à mon frère pour (entre autre) m'avoir permis de squatter son appart à Dijon, merci à mon cousin pour ces moments déconnectés du temps, merci à ma grand-mère qui acquiesce à tout (à croire que j'ai toujours raison...) et merci à Olivier, mon beau-papa pour ces bols d'air frais !

Enfin, merci à toi, mon amoureux pour ces moments de détente, de découverte et de partage. Merci pour toute cette énergie que tu m'as transmis, merci d'être resté à mes côtés et d'avoir trouvé les mots justes dans ces instants intenses et difficiles. Une belle et longue aventure nous attend... FORCE et ROBUSTESSE.

La vie reprend, alors vivons !

À mon grand-père et à André,

« ya pihi irakema,... j'ai été contaminé par ton être- une partie de toi y vit et y grandit »

David Servan - Schreiber

À toi, Jino, sans qui je n'aurai sans doute jamais réalisé cette thèse, tu vois je t'ai écouté !

Table des matières

Table des matières	1
Liste des abréviations	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Avant-propos	11
Contexte Scientifique	13
Chapitre 1 : La réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T	15
I) La thymopoïèse	15
II) L'activation des lymphocytes T	18
1) De l'internalisation à la présentation d'antigènes	18
a) La capture des antigènes	18
b) L'apprêtement et la présentation des antigènes	20
Les antigènes endogènes	22
La voie alternative de présentation de peptides endogènes par le CMH-II	24
Les antigènes exogènes	25
La cross-présentation des peptides exogènes présentés par le CMH-I	26
2) Les signaux d'activation des lymphocytes T	27
III) Les lymphocytes T mémoires	31
IV) Les différentes populations de lymphocytes T	32
1) Les lymphocytes T CD8 ⁺	32
2) Les lymphocytes T CD4 ⁺	34
a) La sous-population des Th1	35
b) La sous population des Th2	36
c) La sous-population des TH17	37
d) La sous-population des TH9	37
e) La sous-population des Th22	38
f) La sous-population des Treg	38
g) La sous-population des Tfh	40
V) La plasticité des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺	40
Chapitre 2 : L'immunosurveillance des tumeurs	43
I) L'implication du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs	43
II) La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs	44
III) Les antigènes de tumeurs	46
1) Le rôle des antigènes de tumeurs dans l'immunosurveillance	47

2) Les stratégies d'identification des antigènes de tumeurs	47
a) L'approche génomique	47
b) L'approche biochimique	48
c) L'approche sérologique	48
d) L'approche d'immunologie inverse	49
3) Les classes d'antigènes de tumeurs	50
a) Les cancer-testis ou <i>cancer-germline</i>	51
b) Les antigènes surexprimés	52
c) Les antigènes de différenciation	53
d) Les antigènes viraux	54
e) Les néoantigènes	54
IV) Les critères de sélections d'un antigène de tumeur	58
1) L'antigène de tumeur dit « idéal »	58
2) L'hétérogénéité tumorale	60
Chapitre 3 : Les réponses immunitaires T antitumorales et leurs modulations	_ 65
I) Le rôle des lymphocytes T CD8 ⁺ spécifiques de tumeurs	65
II) Le rôle des lymphocytes T CD4 ⁺ spécifiques de tumeurs	65
1) L'expression des molécules du CMH de classe II par les tumeurs	66
a) Les lymphocytes T de type Th1	66
b) Les lymphocytes T de type Th9	68
c) Les lymphocytes T de type Th2	68
d) Les lymphocytes T de type Th17	69
2) Les effets immunosuppressifs des lymphocytes Treg dans l'immunité antitumorale	70
III) La modulation de la réponse lymphocytaire T spécifique de tumeurs	71
1) L'inhibition et la destruction de l'immunité antitumorale	72
2) L'activation de l'immunité antitumorale induite par les traitements antitumoraux	74
a) Les effets directs des agents cytotoxiques	74
b) Les effets sur les cellules cancéreuses	75
L'augmentation de l'antigénicité	75
Les inducteurs d'apoptose immunogène	76
La sensibilisation des cellules cancéreuses à l'apoptose	78
c) Les effets sur les cellules du système immunitaire	78
L'activation des cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative	79
L'inhibition des cellules immunitaires inhibitrices	81
Hypothèses de recherche	83
Objectifs	85
Résultats	87

hépatocarcinome cellulaire avancé en rémission complète après traitement pe	as
Sorafenib	
Personalized identification of tumor-associated immunogenic neoepitopes in advance	ed
hepatocellular carcinoma in complete remission after Sorafenib treatment	
Abstract	
Introduction	
Results	
Complete Histologic Response Induced by Sorafenib in Advanced Hepatocellula	r
Carcinoma	
Mutational profiling	
In silico prediction of tumor-specific neoepitopes	
Identification of immunogenic tumor-associated neoepitopes	
Detection of CD4 ⁺ memory T cell responses against tumor-specific neoantigens_	
CD4 ⁺ T cell recognition of processed mutant proteins and HLA restriction	
Discussion	1
Materials and methods	1
Acknowledgments:	1
Deuxième partie : Étude de la signature mutationnelle et de l'induction de	
néoantigènes par un traitement par Oxaliplatine	1
Study of mutational signature and neoantigens immunogenicity induced by Oxalipla	
treatment	1
Abstract	1
Introduction	1
Résultats	1
Identification des mutations apparues après traitement par Oxaliplatine	1
Identification de néoépitopes prédits pour être présentés par le CMH-I de la ligné	ée HT29,
apparus après traitement par Oxaliplatine	1
Discussion et Conclusion	1
Matériel et méthode	1
Discussion et Conclusion	1
I) Identification de néoantigènes immunogènes snécifiques d'un hénatocarcir	nome
cellulaire avancé en rémission complète après traitement par Sorafenib	1
L'immunogénicité d'un CHC due aux néoantigènes identifiés après une rémission c	omplète
L'oncogénicité des néoantigènes immunogènes	inpiere
L'immunité antitumorale spécifique de néoantigènes associés aux CHC	1 1
La répartition et l'expression des néoantigènes	1
Les clones T CD4+ spécifiques des néoépitopes	

L'étude de néopeptides présentés par le CMH de classe I issus d'un CHC avancé en rémi	ssion
complète	_ 145
Les inhibiteurs des immunecheckpoints dans les CHC	_ 145
La clonalité des néoantigènes et les réponses immunitaires les ciblant	_ 146
II) Étude de la présence d'une signature mutationnelle et de néoantigènes	
potentiellement immunogènes induits par Oxaliplatine	_ 148
Le profil des substitutions après de l'Oxaliplatine dans la lignée HT29	_ 150
Les mutations dans les CRC et le traitement par Oxaliplatine	_ 151
Les néoépitopes potentiellement immunogènes dans la lignée HT29 après traitement par	
Oxaliplatine	_ 152
Les immunothérapies dans les CRC	_ 153
La clonalité des néoantigènes et leur ciblage	_ 155
Perspectives	_159
Bibliographie	_165
Annexes	_213

Liste des abréviations

Α	Adénine
aa	Acides Aminés
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
С	Cytosine
CCR	C-C motif chemokine receptor
CD	Cluster de Différentiation
CEA	Antigène Carcino-Embryonnaire
СНС	Carcinome Hepato Cellulaire
CLIP	Protéine de la chaine invariante associée au CMH de classe II
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
СРА	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRC	Cancer colorectal
CTL	Lymphocyte T Cytotoxique
CTLA-4	Antigène 4 de Lymphocyte T Cytotoxique
CXCR	C-X-C motif Chemokine Receptor
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Cellule Dendritique
EBV	Virus de l'Epstein-Barr
G	Guanine
HELZ2	HELicase with Zinc finger 2
HLA	Antigène Leucocytaire Humain
HPV	PapillomaVirus Humain
hTERT	human Telomerase Reverse Transcriptase
IFN	Interféron
Ii	Chaine invariante
IL	Interleukine
LAG3	Lymphocyte-Activation Gene 3
LT	Lymphocyte T
MAGE	Melanoma AntiGEn
MDSC	Myeloid derived suppressive cells

MLL2	Histone-lysine N-methyltransférase 2D (KMT2D)
MSI	Micro Satellite Instable
MSS	Micro Satellite Stable
NK	Natural Killer
Oxa	Oxaliplatine
OxaR	Oxaliplatine résistant
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	Programmed Death-1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
ROR	Retinoic acid-related Orphan Receptor
STAT	Signal Transducer and Activator
Τ	Thymine
ТАА	Antigène Associé à la Tumeur
Тсм	Lymphocyte T Central Mémoire
T _{EM}	Lymphocyte T Effecteur Mémoire
T _{RM}	Lymphocyte T Résident Mémoire
Тѕсм	Lymphocyte T Souche Centraux Mémoire
TCR	Récepteur à l'antigène des Cellules T
Tfh	Lymphocyte T Follicular Helper
TIL	Lymphocyte Infiltrant la Tumeur
TIM3	T cell Immunoglobulin mucin-3
TNF	Tumor Necrosis Factor
ТКІ	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSA	Antigène Spécifique de la Tumeur
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des figures

Figure 1: La lymphopoïèse chez l'Homme	_ 16
Figure 2 : Mécanisme d'internalisation des antigènes exogènes par les cellules dendritiques immatures	_ 19
Figure 3 : Modifications des cellules dendritiques lors de leur maturation	_ 20
Figure 4 : Les voies de présentation des peptides endogènes et exogène via les voies classiques du CMH-I et	−II,
et non classiques	_ 21
Figure 5 : La structure du CMH de classe I et les poches de fixation des peptides dans le sillon du CMH de	
classe I	_ 23
Figure 6 : La structure du CMH de classe II et les poches de fixation des peptides dans le sillon du CMH de	
classe II	_ 26
Figure 7 : L'interaction entre un lymphocyte T et une DC, conduisant à l'activation du lymphocyte	_ 28
Figure 8 : Les populations de T mémoires	_ 32
Figure 9 : La polarisation des lymphocytes T CD4+	_ 35
Figure 10 : Plasticité des lymphocytes T CD4+	_ 41
Figure 11: Le développement tumoral, l'immunosurveillance et théorie de l'immunoédition	_ 45
Figure 12 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses	_ 46
Figure 13 : Quatre des cinq classes d'antigènes de tumeurs reconnus par les lymphocytes T	_ 51
Figure 14 : Les types de mutations génomiques et de néoépitopes pouvant être reconnus par des TCR	_ 55
Figure 15: La liaison de peptide au CMH et au TCR suivant la modification de résidus d'ancrage ou de com	tact
Figure 16 : Le poids de chaque critère identifié pour définir un antigène dit "idéal"	_ 50 _ 59
Figure 17 : Le modèle de modifications génétiques séquentielles, impliquées dans l'oncogenèse d'un cancer	du
côlon métastatique	_ 62
Figure 18 : Impact des sous-populations lymphocytaires T CD4+ dans le microenvironnement tumoral et le contrôle de l'immunité antitumorale	66
Figure 19 : Des exemples d'immunomodulations de chimiothérapies antitumorales	- 75
Figure 20 : Les impacts du microbiote, notamment intestinal, sur l'immunosurveillance antitumorale induite après traitement	_ 79
Figure 21 : Des mécanismes d'action de l'Oxaliplatine	119
Figure 22 : La représentation chimique des adduits d'Oxaliplatine et l'exemple d'un pont interbrin d'ADN	120
Figure 23 : Sélection des SNV spécifiques des mutations de HT29-OxaR	122
Figure 24 : La distribution des mutations SNV entre la lignée HT29WT et HT29-OxaR	123
Figure 25 : La distribution des mutations somatiques non silencieuses situées dans les séquences privilégiée	<i>s</i>
par l'alkylation de l'Oxaliplatine	124
Figure 26 : La signature mutationnelle d'après Alexandrov	125
Figure 27 : Le profil mutationnel des guanines, cibles de l'oxaliplatine, selon le modèle d'Alexandrov	126
Figure 28 : Les étapes de sélections des néopeptides potentiellement immunogènes et présentés par le CMH	de
classe I, issus de la lignée HT29 après traitement par Oxaliplatine	127

Figure 29 : La représentation des scores de liaison prédits pour les peptides mutés et WT au CMH-I	129
Figure 30 : Des mécanismes d'action de l'Oxaliplatine	149

Liste des tableaux

Tableau 1 : La liste des gènes identifiés comme mutés et spécifiques de la lignée HT29-OxaR, et les néopeptidescorrespondant prédits pour lier le CMH-I (HLA-A*0101, HLA-B*3501, *4403 et HLA-C*0401)128

Avant-propos

Selon l'OMS, près d'un décès sur six dans le monde est dû au cancer et son incidence devrait augmenter de 70% ces deux prochaines décennies. Cette pathologie des cellules du soi résulte d'une rupture de l'homéostasie, entre le renouvellement et la mort cellulaire. Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'oncogenèse. Ce processus correspondrait à plusieurs étapes d'évolution clonale, qui a pu clairement être identifié dans le cancer du côlon. Plusieurs modifications génétiques ou épigénétiques vont induire des modifications d'expression ou de fonction de protéines regroupées en trois catégories de gènes ; les gènes suppresseurs de tumeurs, les proto-oncogènes ou les gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Les gènes suppresseurs de tumeurs, ou anti-oncogènes codent des protéines impliquées dans l'inhibition de la prolifération cellulaire excessive, comme la protéine RétinoBlastome (Rb) qui contrôle négativement le cycle cellulaire. La transcription de ces anti-oncogènes peut être diminuée ou inactivée, de même que la fonction de ces protéines. Les proto-oncogènes cellulaires contrôlent positivement la croissance des cellules. Ils correspondent à des gènes codant des facteurs de transcription (ex : JUN, FOS, MYC), de croissance (ex : SIS), des récepteurs aux facteurs de croissance (ex : erbB ou Neu), des molécules impliquées dans la transduction de signaux (ex : ABL, SCR, ou K-RAS) ou encore des gènes impliqués dans les contrôles de l'apoptose (BCL-2). Ces proto-oncogènes vont subir des mutations génétiques ou des réarrangements chromosomiques, conduisant à l'augmentation de leur expression ou de l'activité de la protéine (ex : BCR-ABL). Les gènes impliqués dans l'intégrité cellulaire codent des protéines impliquées par exemple dans la réparation de l'ADN, telles que les protéines Breast Cancer, nommées BRCA1 ou BRCA2.

Ces modifications au sein de la cellule peuvent être dues à plusieurs facteurs extrinsèques, environnementaux comprenant des agents chimiques (ex : agent alkylant) ou physiques (ex : rayons ultraviolet), mais aussi des virus. Mais ces modifications peuvent être induites par des facteurs intrinsèques, liés notamment à des prédispositions génétiques ou épigénétiques familiales, comme la mutation du gène BRCA1 ou BRCA2. De par leur fonction impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN, une mutation inactivatrice de ces protéines BRCA-1 augmente les risques de développer un cancer du sein. Ces facteurs qu'ils soient extrinsèques ou intrinsèques sont surtout impliqués dans l'initiation de l'oncogenèse, puisqu'ils impliquent tous deux des modifications du génome cellulaire, pouvant conduire à la modification d'activité cellulaire. Puis, vient la phase de promotion du cancer, qui concerne la multiplication cellulaire de façon aberrante. Les cellules saines, pour devenir cancéreuses,

doivent acquérir certaines caractéristiques développées par Hanahan et Weinberg en 2000. Ces caractéristiques correspondent à l'indépendance des signaux antiprolifératifs, l'autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance, la résistance à l'apoptose, immortalisation, capacité à induire la néoangiogenèse, la migration et l'invasion des cellules. Ces caractéristiques ont été adaptées en 2011 afin d'inclure les rôles majeurs de l'inflammation favorisant la croissance tumorale, de l'instabilité du génome et des mutations dans l'initiation de l'oncogenèse. De plus, ces évènements vont impacter le métabolisme énergétique des cellules, mais vont aussi permettre l'échappement de la tumeur à la destruction par le système immunitaire.

Depuis plusieurs décennies, l'implication du système immunitaire dans le contrôle des cancers est largement étudiée. Les liens entre ces deux grands types cellulaires est de mieux en mieux compris et donne naissance à de nouvelles options pour lutter efficacement contre les cellules cancéreuses.

Contexte Scientifique

Chapitre 1 : La réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T

Le système immunitaire protège l'hôte contre les agents pathogènes qu'il rencontre, grâce à la coopération de plusieurs types cellulaires. Les pathogènes doivent être détectés par le système immunitaire, qui va alors mettre en place une réponse appropriée, pour tenter de les éliminer ou du moins de contrôler l'infection. Lors d'une infection, les cellules phagocytaires de l'immunité innée, notamment les Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA), sont les premières à entrer en action. Parmi elles, les lymphocytes B vont pouvoir reconnaitre des épitopes correspondant à des antigènes solubles, s'activer et se différencier en plasmocytes, sécréteurs d'anticorps pouvant conduire à la mort du pathogène. Les CPA, dont les DC, capturent le pathogène et s'activent très tôt après l'infection pour rejoindre les ganglions lymphatiques. Une fois que la CPA a rencontré et activé un lymphocyte T spécifique, celui-ci prolifère de façon clonale. Les lymphocytes T sont les grands acteurs de cette réponse, puisqu'ils possèdent des récepteurs hautement spécifiques d'antigènes et sont plus efficaces dans l'élimination des pathogènes. Une partie des lymphocytes T, mais aussi des lymphocytes B, va permettre de créer une réponse mémoire, qui perdure après plusieurs années et qui permet de réagir plus rapidement lors d'une nouvelle rencontre de ce même pathogène.

I) La thymopoïèse

Les lymphocytes T sont produits dans la moelle osseuse à partir de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH), qui sont totipotentes. Les CSH deviennent des précurseurs lymphoïdes exprimant le CD3, les Cellules Souches Lymphoïdes (CSL), avant leur migration par le sang jusqu'au thymus sous forme de précurseurs lymphoïdes (Fig.1).



Figure 1: La lymphopoïèse chez l'Homme (d'après Weerkamp et al., 2006)

Les cellules progénitrices lymphoïdes vont migrer dans le thymus, dans lequel a lieu le réarrangement de la chaîne β du TCR du thymocyte. Puis un pré-TCR permet de réaliser la sélection positive du thymocyte, pour ensuite subir une sélection négative après avoir réarrangé la chaîne α , pour devenir finalement simple positif, CD4⁺ ou CD8⁺.

Le thymocyte va alors passer par plusieurs stades de développement, passant par un état Double Négatif (DN1) CD4⁻ et CD8⁻, caractérisé notamment par l'expression de CD1a. Puis les cellules vont perdre l'expression de CD1a, pour passer à l'état DN2. À ce stade, les chaînes α et β du TCR commencent à se réarranger, correspondant aux lymphocytes T_{$\alpha\beta$}. D'autres types de lymphocytes T_y existent, mais ne seront pas développés dans ce travail. Le réarrangement des gènes codant les parties variables des TCR consiste à associer plusieurs segments VDJ pour les chaînes β ou VJ, pour les chaînes α , entre eux. Ces régions variables vont, avec leur région constante, former les chaînes α et β qui s'associeront ensemble pour former les TCR. Tout d'abord, les chaînes β vont s'associer à la chaine pré-T α et former le pré-TCR. Si le pré-TCR n'est pas exprimé en surface après un réarrangement non productif de la chaine β , alors un second réarrangement se produit à partir du deuxième locus du gène codant la chaine β . Si le second réarrangement n'est toujours pas productif, alors aucun signal de survie n'est transmis au lymphocyte T, conduisant à sa mort. Cet évènement correspond à la β-sélection de lymphocytes T (Wilson et al., 2001). Cette chaîne pré-T α , indispensable à la sélection β , est remplacée par la chaîne α dès que le réarrangement de sa partie variable, contenant les segments V et J, est terminé.

Les différentes possibilités d'association des segments participent à la diversité du répertoire des TCR. De plus, il existe une région particulière au niveau des jonctions du segment D constituant la diversité jonctionnelle, appelée CDR3, qui interagit principalement avec le peptide antigénique. Cette zone est constituée d'une séquence palindromique (P), mais aussi nucléotidique (N), dans laquelle des nucléotides sont ajoutés en qualité et quantité aléatoires. Un lymphocyte humain présentera alors plus de 500 000 TCR identiques en surface, avec environ 10⁸ possibilités de TCR différents.

La différenciation des thymocytes se poursuit en passant par un état doublement positif (DP), CD4⁺ et CD8⁺, qui présentent un TCR et le CD3 en surface. Ces cellules exprimant en surface leur TCR vont alors subir deux autres sélections, l'une positive, permet de sélectionner les lymphocytes T reconnaissant les complexes CMH-peptides du soi, qui reçoivent un signal de survie, alors que les autres meurent (Fig.1). Cette étape permet d'éliminer les lymphocytes T incapables d'interagir avec le CMH du soi. En effet, les molécules du CMH sont codées par les gènes polymorphiques, nommés *Human Leucocyte Antigen* (HLA), qui permettent une grande diversité, au sein de la population. Cette étape de sélection est nécessaire, puisque les gènes codant le TCR et les CMH sont sur des chromosomes différents, impliquant alors qu'une transmission en bloc est impossible. Ainsi, aucune sélection naturelle n'est réalisée chez un individu pour qu'il puisse produire des TCR qui reconnaissent préférentiellement ses CMH.

Une sélection négative est ensuite réalisée avec la mort du lymphocyte T induite si la reconnaissance du complexe CMH-peptide du soi se produit avec une trop forte affinité (Fig.1). La mise en place de ces différentes étapes de sélections permet d'instaurer la tolérance centrale qui permet le maintien de l'homéostasie de l'autoimmunité (Klein et al., 2014). Entre ces deux étapes de sélection, les DP vont perdre l'expression d'un des corécepteurs et devenir simple positif (SP), soit CD4⁺ soit CD8⁺ et vont exprimer le CD45RA^{high}, CD62L^{high}, CCR7^{high}. En effet, suite à l'étape de sélection positive, le TCR reconnaitra soit le CMH-I, alors l'expression du CD4 sera réprimée, et inversement, si le TCR reconnait le CMH-II, le lymphocyte T sera alors CD4⁺ et CD8⁻. Environ deux pourcents des T naïfs DP survivent aux sélections au niveau du thymus. Les SP vont alors pouvoir quitter le thymus par la voie sanguine. Ces lymphocytes T naïfs CD4⁺ ou CD8⁺ sont en phase G₀ du cycle cellulaire. Les récepteurs CD62L et CCR7 sont responsables de l'extravasion des lymphocytes T vers dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes des muqueuses). Si cette cellule n'y rencontre pas d'antigène immunogène présenté par le CMH d'une CPA professionnelle, alors elle migre dans la circulation sanguine, pour revenir à nouveau dans les organes lymphoïdes secondaires, avec un cycle d'environ 12 à 18h. Ce circuit permet d'augmenter les

chances de rencontrer un antigène immunogène, puisqu'environ 1 lymphocyte T naïf sur 100 000 serait spécifique d'un antigène donné.

II) L'activation des lymphocytes T

Toute cellule de l'organisme, saine ou non, a le potentiel pour être reconnue par les lymphocytes T. L'immunité adaptative permet à l'hôte de se défendre contre les pathogènes, par l'expansion et la différenciation de lymphocytes spécifiques d'un antigène. Cette étape de sélection clonale nécessite la présentation d'un peptide par le CMH en surface par une CPA professionnelle (Zinkernagel and Doherty, 1974).

1) De l'internalisation à la présentation d'antigènes

Les CPA, notamment les Cellules Dendritiques (DC), sont continuellement en action. Elles capturent et présentent en surface des antigènes du soi pour lesquelles elles induisent une tolérance. Les DC peuvent aussi présenter des antigènes considérés comme étrangers ou dangereux. Les DC immatures exprimant de nombreux récepteurs de chimiokines, vont migrer de leur site de synthèse, la moelle osseuse, au site de l'infection ou de l'inflammation. Ces DC immatures vont être recrutées au niveau de ces sites par une forte production en chimiokines, notamment *Macrophage Inflammatory Protein 3* α (MIP3 ou CCL19) qui fixe son récepteur CCR6 sur les DC immatures (Bonnotte et al., 2004; Charbonnier et al., 1999). Les DC immatures détectent et capturent des antigènes en permanence et jouent ainsi le rôle de sentinelle.

L'antigène sera alors capturé par la DC immature par plusieurs mécanismes possibles puis, tout en s'activant, la DC va préparer l'antigène pour le présenter sous forme de peptide. L'activation des DC, notamment d'origine myéloïde, va entrainer une augmentation transitoire de leur capacité à internaliser des antigènes (West et al., 2004), qui sera ensuite perdue dans les DC matures.

a) La capture des antigènes

Avant tout, les CPA internalisent des antigènes d'origines diverses, via plusieurs mécanismes (Fig. 2). Tout d'abord, la macropinocytose est un mécanisme d'internalisation non sélectif et permet la capture en quantité importante d'antigènes solubles. Ce phénomène dépend du réseau de filament d'actine pour le bourgeonnement de la membrane cellulaire, jusqu'à la formation de vacuoles cytoplasmiques, les pinosomes (Lim and Gleeson, 2011). Ensuite la

phagocytose, via le réseau de microfilament d'actine, permet l'internalisation de bactéries, de virus ou même des cellules apoptotiques ou nécrotiques (Parra et al., 2012; Sancho et al., 2009). Enfin, l'endocytose par la formation de vésicules de clathrine ou cavéoline, permet l'internalisation de macromolécules. La phagocytose et l'endocytose sont médiées par des récepteurs spécifiques, exprimés par les CD immatures, qui permettent la reconnaissance et la capture des antigènes.



Figure 2 : Mécanisme d'internalisation des antigènes exogènes par les cellules dendritiques immatures.

Les CPA immatures, dont les DC, vont internaliser les antigènes exogènes de taille et de nature différentes, par divers mécanismes ; la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose.

Ces antigènes capturés vont pouvoir être la cible de réponses immunitaires efficaces, suite à la réception par les DC de signaux activateurs indispensables pour l'initiation d'une immunité adaptative (Charles A Janeway et al., 2001). Les DC sont activées au site de l'infection par leurs récepteurs les *Pattern Recognition Receptor* (PRR). Ces PRR regroupent des récepteurs membranaires, les *Toll Like Receptor* (TLR) et les récepteurs du groupe des Lectine C (CLR), et d'autre cytoplasmiques, les *NOD-Like Receptors* (NLR) et les *RIG-I Like Receptor* (RLR). Ces PRR sont spécifiques des *Pattern Associated Molecular Pathogens* (PAMP), appelés aussi *Microbial Associated Molecular Pathogens* (MAMP), ou spécifiques des *Danger Associated Molecular patterns* (DAMP). Les PAMPs, correspondant à des signaux exogènes, peuvent être caractérisés par des signaux de danger ou de dommage, liés par exemple à des infections virales, bactériennes, ou encore à l'apparition de tumeurs (Janeway et al., 1989). Les DAMPs, correspondant à des signaux endogènes, peuvent être différents produits cellulaires, comme par exemple les protéines *High-Mobility Group Box 1* (HMGB1), les protéines de choc thermique (HSP pour *Heat Shock Protein*) (Lotze and Tracey, 2005). À l'issue

de la réception du signal de danger par les DC, pouvant être des cytokines inflammatoires, CD40/CD40-L ou encore des DAMP ou PAMP (Matzinger, 1998), celles-ci s'activent.

L'activation des DC s'accompagne aussi d'une expression du marqueur d'activation CD83, de l'augmentation de la quantité de molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40), ainsi que des complexes du CMH en surface (Fig. 3).



Figure 3 : Modifications des cellules dendritiques lors de leur maturation (d'après Hubo et al., 2013).

La maturation des DC va conduire à l'augmentation de l'expression de molécules de CMH et de costimulation à leur surface. Les DC vont aussi migrer du site de leur activation jusqu'aux ganglions lymphatiques par l'expression de récepteurs CCR7 spécifiques des chimiokines CCL19 et CCL21. Les DC matures pourront ainsi activer les lymphocytes T naïfs.

Les DC matures vont aussi diminuer leurs capacités à internaliser les antigènes et l'expression de certains récepteurs de chimiokines comme CCR6. Les DC matures ont en revanche une forte expression de CCR7, ce qui permet leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Après l'internalisation, les CPA doivent préparer l'antigène en peptide pour pouvoir le présenter en surface cellulaire grâce aux molécules du CMH, aux lymphocytes T.

b) L'apprêtement et la présentation des antigènes

Les lymphocytes T CD8⁺ ne peuvent reconnaitre que des peptides provenant principalement des protéines endogènes, présentés par les molécules CMH-I. En revanche, les CD4⁺ vont pouvoir reconnaitre majoritairement des peptides d'origine exogène, présentés par les molécules CMH-II, par l'intermédiaire des CPA, ou directement sur d'autres cellules après une expression du CMH-II induite par l'IFN-γ. Les gènes HLA (*Human Leucocyte Antigen*) sont organisés en nombreuses régions codantes avec pour les CMH de classe I, les régions HLA-A, -B et –C et pour les CMH de classe II, les régions HLA-DP, DQ et DR. Ces molécules du CMH sont des glycoprotéines transmembranaires et partagent des caractéristiques structurales communes, ainsi qu'un rôle important dans l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes.

Plusieurs situations montrent que ce système de présentation suivant l'origine de l'antigène n'est pas un processus strict. Les mécanismes d'apprêtement et de présentation du peptide diffèrent suivant l'origine de l'antigène et le type de molécules du CMH qui les présentera.



Figure 4 : Les voies de présentation des peptides endogènes et exogène via les voies classiques du CMH-I et –II, et non classiques.

Les antigènes endogènes cytoplasmiques sont dirigés au protéasome pour leur dégradation, et seront transportés par l'intermédiaire des molécules *transporter activated peptide* (TAP) dans le réticulum endoplasmique (RE). Certains peptides issus de cette dégradation sont associés aux molécules du CMH de classe I, puis transportés à la surface cellulaire afin d'être présentés aux lymphocytes T CD8⁺. Les peptides issus d'antigènes exogènes, provenant du milieu extra cellulaire, sont internalisés puis transportés jusque dans l'endosome pour suivre la voie endocytaire et être dégradés. Ces peptides vont fusionner avec d'autres vésicules contenant les molécules de CMH-II nouvellement synthétisés et seront ainsi dirigés à la membrane plasmique pour y être présentés aux lymphocytes T CD4⁺. Ces voies classiques de présentation des peptides sont supplémentées par les voies non classiques de présentation des peptides endogènes, par le CMH-II, par le biais de l'autophagie, mais aussi la cross-présentation des peptides exogènes par le CMH-I. Deux voies de cross-présentation sont possibles, la voie vacuolaire qui passe par la fusion de vésicules contenant des peptides exogènes avec les vésicules

d'internalisation des molécules de CMH-I recyclées, ou la voie cytosolique qui oriente des antigènes exogènes internalisés au protéasome.

Les antigènes endogènes

Les antigènes endogènes sont issus de protéines synthétisées par la cellule elle-même. Cette voie d'apprêtement peut se dérouler dans toutes les cellules qui expriment le CMH-I. Ce phénomène permet de réguler le taux protéique, d'éliminer les protéines dénaturées ou mal repliées et d'assurer un turnover continuel des protéines cellulaires, mais peut aussi concerner des protéines virales.

Tout d'abord, les protéines poly-ubiquitinylées vont être adressées et dégradées en peptides par un ensemble de sous-unités protéiques, appelé protéasome. Ce complexe protéique existe sous plusieurs formes pouvant toutes intervenir dans une même cellule. Certains protéasomes peuvent être composés de quelques sous-unités codées par des gènes inductibles par l'IFN- γ entre autres. L'activité enzymatique de ce type de protéasome peut donc être influencée par l'environnement cellulaire, modulant les sous-unités exprimées. Généralement, le protéasome est le complexe protéolytique classique, composé d'une sous unité 20s, ellemême composée de 14 anneaux cylindriques qui possèdent ou non une activité protéasique. Cette sous unité 20s est associée à un composant régulateur 19s, chargé de sélectionner les protéines ubiquitinylées, formant ensemble le complexe 26s. Ce complexe va donc éliminer les résidus ubiquitines et dégrader les protéines. Un autre complexe est l'immunoprotéasome, exprimé uniquement dans les DC matures ou immatures et dans certaines cellules tumorales, sous l'influence de l'IFN- γ ou du TNF- α . L'immunoprotéasome possède une composition différente, avec le remplacement de la sous-unité 20s. Il est admis que la grande majorité des peptides peut être synthétisée par ces deux complexes, en revanche certains peptides semblent être spécifiquement produit par l'un ou l'autre (Chapiro et al., 2006; Morel et al., 2000). Les protéines entrant dans ces complexes protéolytiques seront linéarisées et dégradées en courtes séquences peptidiques, allant de 2 à 30 acides aminés (aa). Ces peptides vont être transloquées dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'action de protéines de transport hétérodimèriques, associées à la préparation d'antigène (TAP), TAP1 et TAP2. Ces protéines transmembranaires prennent en charge des peptides de 8 à 13 aa et agissent de façon ATP-dépendante. Une fois dans le RE, les peptides vont se lier aux molécules de CMH-I (Vyas et al., 2008).

Les CMH de classe I sont composés d'une chaîne lourde α associée à la β 2microglobuline, de façon non covalente. Cette chaîne α permet l'ancrage à la membrane par son segment transmembranaire, qui se prolonge par une queue cytoplasmique. Dans sa partie extracellulaire, la chaîne α présente trois domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Une poche de fixation du peptide est créée entre le domaine $\alpha 1$ et $\alpha 2$, située sur la face supérieur de la molécule de CMH-I (Fig. 5).

Les peptides pouvant se fixer au CMH-I, ce qui correspond à l'étape de chargement du peptide, ont une taille généralement comprise entre 8 et 10 aa (Kisselev et al., 1999). Les peptides peuvent devenir des nonamères après l'action de protéases libres du RE telles que ERAP. Les chaines α des complexes CMH-I synthétisées dans le RE vont s'associer à des protéines chaperonnes de façon transitoire, pour les stabiliser, comme la calnexine. Puis, la chaine α va s'associer à la β 2-microglobuline qui est indispensable à l'expression membranaire de la chaîne α et participe à la stabilité du CMH-I, mais s'associe aussi aux protéines chaperonnes ; la calréticuline et la tapasine. Le domaine α 3 interagit avec le CD8, expliquant sa haute conservation par les différents allèles.



Figure 5 : Structure du CMH de classe I et les poches de fixation des peptides dans le sillon du CMH de classe I (d'après Rammensee and Singh-Jasuja, 2013; Themes, 2016).

Le peptide est maintenu dans une conformation allongée au sein du sillon peptidique formé par les hélices α des domaines α 1 et α 2 (Fig. 5). Ce sillon qui se referme aux extrémités induit une fixation sélective des peptides ayant, à leurs extrémités N-ter et C-ter, des résidus dit d'ancrage, qui sont enfouis dans le plancher de feuillets β . Les peptides présentant les mêmes natures de résidus d'ancrage, se fixent généralement aux mêmes molécules de CMH. Ce phénomène a permis d'établir des prédictions concernant la fixation de peptides aux molécules de CMH. La région du peptide située entre les sites d'ancrages forme un arc qui s'éloigne du plancher du sillon, étant ainsi plus enclin à être reconnu par le TCR (Fig. 5).

Finalement, les complexes CMH-I-peptide vont transiter au travers du RE, jusque dans l'Appareil de Golgi pour être adressés à la membrane cellulaire, via des vésicules d'exocytose.

La voie alternative de présentation de peptides endogènes par le CMH-II

Les antigènes exogènes sont présentés par les molécules du CMH-II aux lymphocytes T CD4⁺, mais il a été démontré que des peptides d'origine endogène pouvaient eux aussi être présentés par le CMH-II aux T CD4⁺ (Dongre et al., 2001; Rudensky et al., 1991; Zhou and Blum, 2004). L'un des mécanismes impliqué dans cette voie de présentation non classique est l'autophagie, en particulier la macroautophagie (Crotzer and Blum, 2010; Münz, 2011, 2012; Nimmerjahn et al., 2003). Cependant, d'autres voies ont pu être identifiées dans cette présentation non classique aux molécules de CMH-II, comme celle passant par la voie du protéasome, des protéines TAP et des protéines chaperonnes (Li et al., 2005; Mukherjee et al., 2001; Tewari et al., 2005), ou passant par des transferts intercellulaires de molécules de CMH-II par trogocytose ou par l'intermédiaire d'exosomes (Nakayama, 2015).

Lors du vieillissement, ou d'un stress cellulaire comme une carence en nutriments, l'autophagie est activée par la cellule. Ce processus dynamique permet la mise à disposition des composés essentiels à la survie de la cellule, par la dégradation de protéines cellulaires. L'activation de l'autophagie est associée à une augmentation de la présentation d'antigènes nucléaires et cytosoliques par le CMH-II (Dengjel et al., 2005). Toutefois, l'autophagie n'est pas seulement impliquée dans la présentation d'antigènes cellulaires, puisqu'elle est permet aussi la présentation d'antigènes exogènes (Lee et al., 2010; Münz, 2012).

L'initiation de la macroautophagie consiste en la création d'une structure composée d'une membrane au niveau cytoplasmique, appelée autophagosome, à partir d'une structure spéciale, le phagophore (Strømhaug et al., 1998). Cette étape passe par l'action des protéines spécialisées dans l'autophagie, comme le complexe Atg-6 (ou Beclin-1)/PI3kinase de classe III. La seconde étape est une élongation de cette membrane, qui repose essentiellement sur deux complexes protéiques. Tout d'abord, Atg-5-Atg-12 présent sur le pré-autophagosome va permettre le recrutement du second complexe à la membrane, Atg-8-PhosphatidylEthanolamine (Atg-8-PE ou LC3II). Ce deuxième complexe est impliqué dans l'élongation de la membrane, jusqu'à former l'autophagosome. Cette vésicule séquestre une partie du contenu cytoplasmique, puis va fusionner avec un lysosome, formant ainsi l'autolysosome (Münz, 2012). Cette fusion conduit à une acidification de la vésicule nécessaire à l'activation de protéases mais aussi à la liaison peptide endogène-CMH-II. Les complexes peptides-CMH-II seront ensuite présentés en surface cellulaire.
Les antigènes exogènes

Les antigènes exogènes, présents dans l'environnement extracellulaire, vont être internalisés puis chargés sur les molécules de CMH-II. La voie classique de chargement des antigènes exogènes passe par la voie endocytique (Villadangos et al., 1999), comprenant des étapes de dégradation de l'antigène en peptides et leurs chargements au CMH.

La présentation des peptides au CMH-II peut se diviser en plusieurs étapes (Blum et al., 2013; Neefjes et al., 2011) et se déroule dans différents compartiments : l'endosome précoce (pH 6 – 6.5), l'endosome tardif ou endolysosome (pH 5 – 6) et enfin le lysosome (pH 4.5 – 5). Le passage des antigènes dans ces compartiments va entrainer l'activation de protéases, glycosydases, lipases, nucléases ou encore des phosphatases, par l'acidification progressive du milieu de ces vésicules (Villadangos et al., 1999). Ces enzymes vont permettre la dégradation progressive des antigènes en peptides de 13 à 18 aa (Robinson and Delvig, 2002). Après l'internalisation des antigènes exogènes et leur dégradation en peptides, ceux-ci doivent alors s'associer aux molécules de CMH-II.

Les CPA expriment de façon constitutive le CMH-II, mais l'IFN-y peut aussi induire une expression du CMH-II par les cellules épithéliales. Cette glycoprotéine transmembranaire est composée de deux chaînes différentes : α et β , associées entre elles de façon non covalente. Elles possèdent toutes deux un domaine transmembranaire et des extrémités C-terminales (Cter) cytosoliques. La chaîne α est composée de deux domaines α (α 1 et α 2) et la chaîne β , de deux domaines β (β 1 et β 2) (Fig. 6). Les domaines distaux, α 1 et β 1 forment le sillon peptidique du CMH-II, de structure tridimensionnelle comparable à celle du CMH-I, avec cependant des extrémités plus ouvertes que ce dernier. Dans le RE, les chaines α et β du CMH-II vont pouvoir s'associer sous forme de trimères avec trois chaines invariantes li. Cette chaîne li est une protéine chaperonne qui permet l'assemblage et la stabilisation des chaines α et β du CHM-II, mais empêche aussi la fixation de peptides endogènes naturellement présents dans le RE (Roche and Cresswell, 1991; Roche et al., 1992). Ce complexe CMH-II-li va transiter par l'appareil de Golgi jusqu'aux endosomes précoces, puis tardifs. Dans les compartiments endocytaires, une augmentation de l'acidité active les enzymes protéolytiques. Ainsi, la chaine li va être progressivement clivée par des protéases au niveau de ses extrémités, jusqu'à former le peptide CLIP (class II associated invariant peptide) (Roche and Cresswell, 1991). CLIP occupe le sillon peptidique et confère au CMH-II une grande stabilité.

Les vésicules endocytaires contiennent aussi les peptides issus de protéines exogènes préalablement internalisées par la DC. Ainsi, un peptide antigénique de plus forte affinité que CLIP va pouvoir se fixer aux molécules de CMH-II. Les peptides de moindre affinité pour le CMH-II peuvent aussi s'y fixer par l'intermédiaire de la protéine chaperonne HLA-DM qui catalyse l'échange de ces deux peptides (Mellins and Stern, 2014). Les peptides peuvent faire jusqu'à plus de 20 aa, mais généralement ce sont des peptides de 13 à 18 aa qui fixent le sillon peptidique (Sant et al., 1999). Une région centrale de 13 aa semble déterminante pour la fixation du peptide, dûe à la présence de résidus d'ancrages distribués le long du peptide et principalement dûe aux acides aminés situés en position 1, 4, 6 et 9 qui correspondent aux points de contact principaux (Fig. 6). Les vésicules contenant les complexes peptide- CMH-II vont être adressées à la membrane plasmique et leurs membranes vont fusionner.



Figure 6 : La structure du CMH de classe II et les poches de fixation des peptides dans le sillon du CMH de classe II (d'après Rammensee and Singh-Jasuja, 2013; Themes, 2016).

Tous ces évènements se déroulent rapidement, puisque le peptide est présenté en surface par le CMH-II seulement 1 à 3h après l'internalisation de l'antigène exogène.

Il existe une voie légèrement différente pour la présentation de peptides exogènes. En effet, les phagosomes comportant des peptides d'origine exogène vont alors fusionner avec les vésicules lysosomales contenant les molécules de CMH-II recyclées à partir de la membrane plasmique (Lee et al., 2010).

La cross-présentation des peptides exogènes présentés par le CMH-I

Des peptides issus de protéines exogènes vont pouvoir être associés aux molécules de CMH-I, grâce à une voie alternative de présentation utilisée notamment par les DC et vont ainsi être présentés aux lymphcytes T CD8⁺ (Rocha and Tanchot, 2004), c'est le phénomène de crossprésentation (Albert et al., 1998). Trois mécanismes pourraient être impliqués dans cette voie, avec tout d'abord une voie vacuolaire indépendante des molécules TAP. Les peptides issus de protéines exogènes, après leur internalisation par la DC, vont être en présence de molécules du CMH-I, avec lesquelles les peptides vont pouvoir s'associer. Un autre mécanisme, la voie cytosolique, utilise le protéasome et les molécules TAP (Ackerman et al., 2006). Ici les protéines exogènes internalisées vont se retrouver dans le cytosol pour être dégradées en peptides. Les peptides vont s'associer aux molécules TAP pour rejoindre le RE et la voie classique d'apprêtement par le CMH-I.

Cette voie non classique permet aux DC de présenter aux lymphocytes T CD8⁺ un plus large panel de peptides issus de corps apoptotiques (Albert et al., 1998), de cellules nécrotiques (Larsson et al., 2001) ou encore des protéines liées aux protéines de choc thermique (HSP pour Heat Shoc Protein) (Arnold-Schild et al., 1999), de complexe immuns (Regnault et al., 1999), mais aussi d'exosomes (Wolfers et al., 2001).

Les voies de présentation des antigènes endogènes et exogènes ne sont pas séparées de façon distincte. Certains peptides endogènes peuvent alors être présentés par le CMH-II et inversement pour les antigènes exogènes et le CMH-I. Ces possibilités de présentation sont très importantes dans le cas d'une diminution de l'expression du CMH-I, par exemple, lors de l'échappement tumoral. Ainsi les CD4⁺ peuvent tout de même reconnaitre les cellules tumorales par l'intermédiaire d'antigènes endogènes, d'antigènes solubles mais aussi libérées lors de la lyse tumorale. La capacité d'un antigène à induire des réponses immunitaires dépend de sa capacité à être présenté par les molécules du CMH.

Pendant ces évènements de présentation des peptides en surface des DC, celles-ci sont devenues matures, ont quitté le lieu de l'infection et ont rejoint la circulation lymphatique jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, lieu de la rencontre avec les lymphocytes T naïfs.

2) Les signaux d'activation des lymphocytes T

Cette rencontre nécessite trois étapes successives pour une activation efficace d'un lymphocyte T naïf, face à un antigène immunogène (Fig. 7). Tout d'abord la CPA professionnelle doit délivrer aux lymphocytes T spécifiques, un signal d'activation, de prolifération puis de différenciation, indispensables pour générer une réponse immunitaire T efficace.





Signal 1: Le TCR reconnait le complexe peptide présenté par le CMH

Signal 2: Interactions des molécules de costimulation (CD28-CD80/86 et CD40L/CD40) conduisant à la synthèse d'IL-2

Signal 3: Liaison de l'IL-2 à son récepteur CD25, conduisant l'entrée du lymphocyte T dans le cycle cellulaire

Tout d'abord, le complexe TCR-corécepteur (CD4 ou CD8) doit reconnaitre un peptide présenté par des molécules du CMH, constituant le signal 1. En effet, deux types de molécules du CMH classique seront étudiés ici. Les molécules de classe-I, exprimées par la quasi-totalité de cellules nucléées, sont reconnues par les lymphocytes T CD8⁺. Alors que les molécules de classe-II, exprimées de façon constitutive seulement par les CPA, sont reconnues par les lymphocytes T CD4⁺. Cette interaction met en avant la spécificité du TCR pour le complexe CMH-peptide. L'intensité du signal d'activation transmis au lymphocyte T dépend de l'avidité de la cellule T pour sa cible, principalement dépendante de l'affinité du TCR. Plusieurs facteurs peuvent influencer la densité des complexes présentés en surface, telle que l'efficacité d'apprêtement, mais aussi l'affinité du peptide pour le CMH, qui modifie la stabilité du complexe CMH-peptide formé. De plus, l'intensité d'activation des lymphocytes T peut varier en fonction de la durée de contact avec la cellule présentant l'antigène (Melief, 2003). Certaines

molécules d'adhésion, comme les protéines *Lymphocyte Function-associated Antigen*-1 (LFA-1) et CD2 vont permettre d'augmenter l'intensité et la durée du premier signal d'activation des lymphocytes T naïfs. Un lien très étroit se crée au niveau de la zone de contact entre un lymphocyte T et une CPA. Dès lors que le TCR reconnait le complexe CMH-peptide une synapse immunologique se forme, permise par une réorganisation du cytosquelette (Delon and Germain, 2000).

La synapse immunologique est une structure dynamique, dans le temps et l'espace, avec une stabilité pouvant aller de quelques minutes à plusieurs heures (Huppa and Davis, 2003). La synapse est composée de trois régions concentriques. La région centrale correspond à la partie c-SMAC (*Central-Super Molecular Activation Complex*). La zone de contact favorise les interactions ligand / récepteur, dont les complexes TCR-CD3 / CMH-peptide, CD80 / et CD86 / CD28, mais aussi CD80 / et CD86 / CTLA-4 (Fig. 7). Cette zone est aussi riche en molécules d'adhésion et en protéines de signalisation comme la Protéine Kinase C- γ (PKC- γ). La p-SMAC (*peripheral-SMAC*) constitue la région intermédiaire, composée de molécules d'adhésion, avec par exemple la protéine LFA-1. La région distale, appelée d-SMAC (distal-SMAC), contient notamment la phosphatase CD45 (Savage et al., 2002).

Plusieurs grands évènements vont alors se mettre en place pour la cellule T, avec l'élaboration d'un second messager qui amplifie le signal par l'activation d'une cascade de signalisation enzymatique. Toutes les protéines membranaires impliquées dans la transduction du signal sont regroupées par le rapprochement des radeaux lipidiques, favorisant leurs actions.

La cascade de réactions enzymatiques passe par deux tyrosines kinases de la famille Src. En effet, la protéine Lck est liée à la partie intracytoplasmique des corécepteurs et Fyn lie au niveau intracytoplasmique les chaines ζ et CD3. Src et Fyn activées vont phosphoryler les séquences ITAM des domaines intracytoplasmiques de CD3 (Irving et al., 1993). Cet évenement permet le recrutement et l'activation par phosphorylation de ZAP-70, qui va à son tour phosphoryler la protéine *Linkier for Activation of T-cell* (LAT), une molécule adaptatrice ancrée à la membrane. LAT va recruter et à son tour activer par phosphorylation plusieurs protéines impliquées dans la signalsition de l'activation du T naïf, comme la PLC- γ . Cette dernière va cliver le PhosphoInositol-2-Phosphate (PI2P), un composant de la bicouche phospholipidique, en DiAcylGlycérol (DAG) et en Inositol-3-Phosphate (IP3). Le DAG va activer la PKC impliquée dans l'activation de la voie passant par NF- κ B, un facteur de transcription impliqué dans la synthèse de nombreux gènes, dont l'InterLeukine-2 (IL-2). Et l'IP3 va entrainer une libération massive de Ca²⁺ contenue dans les réserves du RE, mais aussi l'ouverture des canaux calciques membranaires. Par l'intermédiaire de la calmoduline, cette libération de Ca²⁺ entraine l'activation par phophorylation et la translocation du facteur de transcription NF-AT dans le noyau, qui va lui aussi pouvoir activer la transcription de nombreux gènes.

La voie des MAP kinases est aussi activée par l'intermédiaire d'une petite protéine g nommée RAS. L'activation de cette voie de signalisation aboutit à l'activation de la protéine ERK, qui va à son tour activer la transcription de plusieurs gènes, notamment Fos. Fos va être phosphorylé et va s'associer à Jun, formant ainsi le complexe AP-1. Ce complexe protéique est lui aussi un facteur de transcription essentiel pour l'activation des lymphocytes T et intervient dans la régulation de la transcription de l'IL-2 (Sprent and Kishimoto, 2002).

Les nombreux gènes induits par l'activation de ces facteurs de transcription ont une synthèse contrôlée par une transcription différentielle des gènes immédiats, précoces, puis tardifs. Dès les trente premières minutes après la phase d'activation, les gènes immédiats sont activés après la reconnaissance. Ces gènes codent surtout des protéines impliquées dans l'activation de la transcription d'autres gènes. Ces facteurs de transcription, tel que c-fos, NF- κ B, c-Myc, c-Jun ou encore NF-AT, activent la transcription de gènes impliquées dans la communication intercellulaire et la différenciation des cellules (Fig. 7). Ces gènes précoces codent entre autre pour l'IL-2 et son récepteur (CD25), l'IL-3, l'IL-6, l'IFN- γ et sont exprimés entre une à deux heures après l'activation.

Le lymphocyte T engagé avec la CPA va pouvoir stimuler lui aussi la CPA, dans un processus réciproque d'activation qui va induire une forte prolifération des lymphocytes T spécifiques (Acuto and Michel, 2003). En effet, le lymphocyte T va par l'intermédiaire de la molécule CD40L, stimuler le récepteur CD40 de la CPA, induire une augmentation de l'expression de CD80 et CD86, qui eux même vont augmenter l'expression de CD28 de la cellule T. Ces molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 (Lenschow et al., 1996) se lient respectivement à des protéines présentes en surface du lymphocyte T, à savoir CD40L et CD28 respectivement. Ce deuxième signal participe à la synthèse d'IL-2, de son récepteur (CD25), mais aussi l'expression de CD40L, par le lymphocyte T (Shahinian et al., 1993). La liaison CD40/CD40L active l'expression d'autres molécules de co-stimulation, telles que la molécule ICOSL, OX40L, 4.1BBL. Les molécules de co-stimulation peuvent activer plus spécifiquement certaines sous-populations de lymphocytes T CD4, comme OX40 pour les T CD4⁺, 4.1BB pour les CD8⁺, ICOS sur les lymphocytes TFH (Whitmire and Ahmed, 2000). Ce deuxième signal induit par des molécules membranaires de co-stimulation (Matzinger, 1998, 2002), permet d'éviter l'anergie des T naïfs activés, ainsi que la tolérance vis-à-vis de l'antigène

cible (Kearney et al., 1994), mais évite aussi une apoptose précoce en absence de ce signal (Noble, 2000).

La reconnaissance du complexe TCR-CD3/peptide-CMH permet à la cellule T en phase G_0 de proliférer (Fig. 7). En effet, les signaux de co-stimulation du lymphocyte convergent vers deux complexes de signalisation *mamalian Target Of Rapamycin*, mTORC1 et mTORC2, qui constituent le troisième signal. L'activation de la voie impliquant l'IL-2, essentielle pour les lymphocytes T (Schwartz et al., 1992), active la voie de signalisation mTOR. La voie mTOR une fois activée conduit à l'entrée du lymphocyte T dans le cycle cellulaire, en passant de la phase G_0 à G_1 et permet aussi l'activation de son métabolisme (Fingar et al., 2004).

Après deux jours, les gènes tardifs codant des molécules d'inactivation sont transcrits comme un gène codant un antagoniste de CD28 le *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen* (CTLA-4), qui lie CD80 et CD86 sur les CPA avec une plus forte affinité que CD28. Ainsi, les cellules formant la synapse immunologique vont se séparer après dislocation de celle-ci, induite par la mitose initiée par le lymphocyte T et l'augmentation de l'expression de CTLA-4. Ces évènements signent l'arrêt du signal d'activation (Egen et al., 2002), rendu possible par l'action de la protéine CD45. Cette dernière agit après l'activation via le TCR, en déphosphorylant les protéines impliquées dans cette voie de signalisation. La mise en place de ce rétrocontrôle négatif permet d'éviter la prolifération incontrôlée des T activés. Ainsi la boucle d'activation du T, médiée par la liaison CD28/CD80-CD86 est inactivée par la boucle de rétrocontrôle négatif, engageant CTLA-4/CD80-CD86 (Chambers et al., 2001).

Les cellules effectrices et mémoires ne nécessitent pas la réception du signal de costimulation, alors qu'il est indispensable en complément de l'engagement du TCR des T naïfs. Les lymphocytes T ayant rencontré l'antigène vont alors proliférer par expansion clonale dans les ganglions lymphatiques. Les signaux d'activation des T naïfs vont agir de façon synergique pour induire leur différenciation en cellules mémoires ou effectrices, mais aussi sa migration en dehors des organes lymphoïdes secondaires, afin qu'ils puissent reconnaitre et éliminer les cellules cibles (Sallusto et al., 1999).

III) Les lymphocytes T mémoires

Les cellules mémoires sont les seules à survivre une fois l'infection éliminée. Cette mémoire confère au système immunitaire la capacité de répondre plus rapidement en cas de nouvelle infection par le même pathogène. De ce fait, les T mémoires parcourent l'organisme afin de rencontrer l'antigène cible.



Il existe plusieurs sous-populations de cellules mémoires, les lymphocytes T Centraux Mémoires (T_{CM}), Effecteurs Mémoires (T_{EM}) (Sallusto et al., 1999, 2004), qui expriment toutes deux le CD127 de façon constitutive (Stemberger et al., 2007), les Centraux Mémoires Souches (T_{SCM}) (Gattinoni et al., 2011) et les Résidents Mémoires (T_{RM}) (Fig. 8). Les T_{CM} expriment CD45RO, CD62L, CCR7 et produisent de l'IL-2 en grande quantité (Lanzavecchia and Sallusto, 2005). Ces centraux mémoires sont plus sensibles à une nouvelle rencontre avec l'antigène que les T naïfs, leur permettant une action plus rapide. Les T_{CM} permettent de régénérer les T_{EM} .(Lanzavecchia and Sallusto, 2000). Les Tscm sont des cellules mémoires les plus proches du phénotype des T naïfs, elles correspondent aux cellules mémoires les moins différenciées, pouvant évoluer en T_{CM} . (Gattinoni et al., 2011; Lugli et al., 2013). Les T_{RM} résident de façon permanente au sein des tissus cibles non lymphoïdes, même une fois l'infection éliminée (Gebhardt and Mackay, 2012).

Cependant, les T_{CM} ne peuvent pas développer de fonctions effectrices propres, à *contrario* des T_{EM} , mais ils profilèrent rapidement et se différencient en effecteurs. En ce qui concerne les T_{EM} , leur recirculation dans le sang en passant surtout par la rate et les organes non lymphoïdes est permise par l'absence d'expression du CCR7 et du CD62L (Seder and Ahmed, 2003). Ainsi, en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène, ils peuvent utiliser leurs fonctions effectrices cytotoxiques notamment, mais aussi la sécrétion de cytokines, sans passer au préalable par une étape de différenciation.

IV) Les différentes populations de lymphocytes T

1) Les lymphocytes T CD8⁺

Une fois le lymphocyte T CD8⁺ activé en T cytotoxique (CTL) par la reconnaissance avec le complexe peptide-CMH-I, le cytosquelette d'actine va subir un réarrangement. Les centres organisateurs des microtubules vont s'orienter en direction de la synapse et aider au regroupement des molécules de signalisation, de l'appareil sécrétoire et donc à la libération de cytokines et granules cytolytiques au sein de l'espace intercellulaire créé par la synapse immunologique (Friedl et al., 2005; Grakoui et al., 1999). La libération de ces granules, contenant des enzymes lytiques dont la perforine et les granzymes (A et B), est un phénomène dépendant du calcium, qui est libéré de façon massive du RE, après la stimulation antigénique. La perforine une fois libérée va créer des pores dans la membrane phospholipidique de la cellule cible (Lieberman, 2003), permettant l'entrée des granzymes au sein de la cellule, mais peut aussi induire à une différence de pression osmotique, conduisant aussi à la mort de la cellule cible. Les granzymes vont activer la voie des caspases pour induire l'apoptose des cellules cibles. Les CTL vont sécréter de l'IFN-γ et du TNF-α qui stimulent les macrophages. De plus, l'IFN-γ a un pouvoir chimioattractant et va permettre le recrutement des cellules phagocytaires au site d'activation.

Toutefois, il a été démontré que la granzyme B peut pénétrer à l'intérieur de la cellule, même en absence de perforine (Pinkoski et al., 1998), grâce à sa fixation sur un récepteur spécifique, le mannose-6-phosphate, qui permettent son endocytose par la cellule cible (Motyka et al., 2000). Le mécanisme d'endocytose impliqué reste encore mal connu (Trapani and Smyth, 2002), mais l'entrée de ces molécules dans la cellule cible déclenche aussi l'apoptose (Trapani et al., 2000). Il a cependant été démontré dans un modèle murin déficient en perforine, que les souris sont incapables d'éliminer des virus, ou de contrôler la progression des cellules cancéreuses (van den Broek et al., 1996; Kägi et al., 1994).

Les CTL peuvent aussi induire la lyse des cellules cibles par interaction avec la molécule FasL, présente en surface des cellules T, avec son récepteur en surface des cellules cibles, Fas. Ce récepteur de mort appartient à la famille du TNF-R. La fixation du ligand à son récepteur entraine la trimérisation de TNF-R, le regroupement de leur *Death Domain* (DD) (Itoh and Nagata, 1993), leur activation et va permettre la formation du complexe *Death Incucing Signaling Pathway* (DISC).(Kischkel et al., 1995) Les DD vont ainsi pouvoir fixer la protéine adaptatrice *Fas Associated Death Domain* (FADD) (Chinnaiyan et al., 1995), qui par son extrémité N-ter *Death Effector Domain* (DED), va pouvoir recruter la procaspase 8 par son domaine DED, la cliver en caspase 8, qui s'homodimérise pour s'activer (Chinnaiyan et al., 1995). Ensuite deux voies vont pouvoir induire l'apoptose, la voie directe par l'intermédiaire de la procaspase 3 clivée et activée par la caspase 8, ou la voie indirecte, par l'intermédiaire de la mitochondrie (Scaffidi et al., 1998). La caspase 8 va pouvoir cliver et activer une protéine pro-apoptotique Bid, qui va entrainer la relocalisation de Bax au niveau de la membrane mitochondriale. Ces évènements permettent la libération de cytochrome C par la mitochondrie, qui s'associe avec la procaspase 9 et Apaf-1 (*apoptosis protease-activatinf factor-1*) pour former le complexe DISC. Ce complexe induit l'activation par clivage de la procaspase 9 en caspase 9, qui va à son tour cliver et activer la procaspase 3. Les CD8⁺ possèdent d'autres récepteurs de mort, pouvant induire l'apoptose impliquant les mêmes voies, tels que TNFR1, DR3, DR4, DR5 ou DR6 (Ashkenazi and Dixit, 1998).

2) Les lymphocytes T CD4⁺

Dès 1986, plusieurs sous-populations d'effecteurs CD4⁺ ont été identifiées, les Th1 et Th2 (T R Mosmann and Coffman, 1989). Aujourd'hui d'autres sous-populations ont été décrites et les CD4⁺ sont une famille très hétérogène de cellules (Fig. 9). L'orientation de la différenciation dépend de l'environnement cytokinique créé par les cellules présentes au voisinage des CD4⁺ (Mosmann and Coffman, 1989), mais aussi de l'activation et la maturation des DC elles-mêmes conditionnées par la nature du pathogène (van Panhuys et al., 2014). Cette communication permet au système immunitaire de s'adapter au mieux, face à la grande diversité des agents pathogènes. Quelques-unes des sous-populations seront développées ici, les T helper -1 (Th1), Th9, TH2, Th17, Th22, TFH (*follicular helper T cell*) et iTreg et nTreg (*induced / natural T regulator*) (Kennedy and Celis, 2008; O'Shea and Paul, 2010; Pardoll and Topalian, 1998).



Figure 9 : La polarisation des lymphocytes T CD4+.

L'environnement cytokinique créé notamment par les DC oriente la polarisation des CD4⁺ et permet d'adapter les réponses immunitaires aux pathogènes.

Parmi elles, certaines ont une action immunostimulante, d'autres à l'inverse inhibent les réponses immunitaires, et enfin d'autres ont un rôle qui reste encore ambiguë. Ces familles se distinguent par l'activation de facteurs de transcription spécifiques et par une signature cytokinique qui leur est propre (Fig. 9) (Fang and Zhu, 2017; Kennedy and Celis, 2008; Kim and Cantor, 2014).

a) La sous-population des Th1

Les CD4⁺ naïfs sont orientés vers une polarisation de type Th1 sous l'influence d'IFNγet d'IL-12 (Fig. 9) (Trinchieri et al., 2003). Les Th1 sont impliqués notamment dans la réponse dirigée contre des pathogènes intracellulaires comme les virus, les bactéries ou les antigènes de tumeurs (Paul and Seder, 1994; T R Mosmann and Coffman, 1989). Ces cellules sont aussi impliquées dans certaines pathologies autoimmunes, comme le diabète de type 1.

L'IL-12, majoritairement sécrétée par les CPA activées, entraine une cascade d'activation passant par la protéine Signal Transducer and Activator of Transcription 4 (STAT-4) (Szabo et al., 2003). L'IL-2 amplifie cette voie de signalisation en activant STAT-5 qui régule positivement l'expression d'IFN-γ et du récepteur à l'IL-12 (Yamane and Paul, 2012). L'IFN-y après avoir fixé son récepteur sur les lymphocytes T, passe par la voie faisant intervenir STAT-1.(Afkarian et al., 2002) Ces deux voies, passant par STAT-4 et STAT-1, conduisent à l'expression du facteur de transcription *T-box transcription factor* (T-bet). La protéine T-bet induit une activation transcriptionnelle de nombreux gènes comme le récepteur à l'IL-12, l'IL-2, TNF- α ou encore l'IFN- γ (Hwang et al., 2005; Jenner et al., 2009). Ces protéines vont amplifier les mécanismes impliqués dans la polarisation des CD4 en Th1. Les Th1 sont aussi caractérisés par l'expression de récepteurs de chimiokines comme CCR5, mais aussi CXCR3,(Szabo et al., 2000) dont les expressions sont induites par T-bet. CXCR3 est le récepteur des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, sécrétées par les cellules endothéliales de tumeurs par exemple (Lord et al., 2005). Ces chimiokines permettent alors le recrutement des Th1 au site de l'inflammation. En revanche T-bet ne semble pas impliqué dans l'expression de CCR5 qui lie les chimiokines RANTES, MIP-1 α , ou MIP-1 β .

T-bet permet une exclusivité de la polarisation en Th1 en fixant le promoteur de l'IL-4 induisant l'inhibition de sa synthèse et en fixant aussi le facteur de transcription GATA-3 (*GATA-binding protein*) l'empêchant ainsi de se fixer sur ses gènes cibles (Djuretic et al., 2006).

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la polarisation en Th1, comme Runx3 (*runt-related transcription factor*), qui active les gènes codant l'IFN- γ en passant par Eomes, et inhibe la synthèse d'IL-4 (Djuretic et al., 2006). Enfin, Runx1 favorise la polarisation Th1 en réprimant, lui aussi, l'expression GATA-3 (Komine et al., 2003).

Les Th1 ont ainsi la faculté de sécréter de l'IFN- γ (Lighvani et al., 2001), mais aussi du TNF- α et $-\beta$, deux cytokines pro-inflammatoires, qui peuvent stimuler le système immunitaire inné et adaptatif. L'IFN- γ sécrété par les Th1 en grande quantité va pouvoir activer à son tour les cellules NK et les macrophages, mais aussi les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques.

b) La sous population des Th2

Les CD4 naïfs peuvent s'orienter vers une polarisation Th2 sous l'influence des cytokines IL-2 et IL-4 (Fig. 9) (Yamane and Paul, 2012; Zhu and Paul, 2010). La réponse Th2

entraine plutôt une réponse humorale et elle est centrale dans la protection contre les pathogènes extracellulaires (bactéries, toxines et parasites). En effet, les Th2 contrôlent la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps. Les TH2 sont aussi impliqués dans l'induction et la persistance de maladies allergiques comme l'asthme.(Sokol et al., 2009)

L'IL-4 et l'IL-2 vont activer des voies de signalisation conduisant à l'activation du facteur de transcription STAT-5 qui va pouvoir jouer son rôle d'activateur (Glimcher and Murphy, 2000; Zhu et al., 2003). En effet, l'activation de GATA-3 permet d'induire la production des cytokines caractéristiques des Th2, l'IL-4, IL-5, IL-13 (Luckheeram et al., 2012), mais aussi du récepteur de la prostaglandine D2 (CD294), de CCR4 et du récepteur à l'IL-4 (Zhu et al., 2010). De plus l'activation passant par le TCR permet l'activation du facteur de transcription GATA-3 par l'intermédiaire de STAT-6. La voie IL-4-STAT-5 permet l'augmentation de la synthèse de cytokines spécifiques des Th2 et inhibe la différenciation en Th1 en réprimant STAT-4, T-bet et l'IFN- γ (Zhu et al., 2010).

c) La sous-population des TH17

Les Th17 sont inductibles par l'IL-6, IL-21, IL-1 β , IL-23 et le TGF- β (Fig. 9) (Aggarwal et al., 2003; Veldhoen and Stockinger, 2006). Les bactéries extracellulaires et les champignons sont les principales cibles des réponses de type Th17 (Puel et al., 2011), médiées notamment par l'IL-17A. Cette cytokine permet la production de CXCL8 par les macrophages qui induit le recrutement des neutrophiles qui expriment les récepteurs de CXCL8 : CRCX1 et CXCR2. Ils sont impliqués dans certaines maladies auto-immunes (Volpe et al., 2015; Wilke et al., 2011a) et vont jouer aussi un rôle complexe dans l'immunité antitumorale (Bailey et al., 2014).

L'étude in vitro de la polarisation de T CD4⁺ naïfs en Th17 pourrait être induite par l'association de l'IL-23 à l'IL-1 β seule (Wilson et al., 2007) ou l'IL-1 β combinée au TGF β et à l'Il-6.(Volpe et al., 2009) De plus, l'IL-23 et l'IL-1 β induiraient l'activation du facteur de transcription *Receptor-related Orphan Receptor yT* (RORyt) et du récepteur à l'IL-23 et à l'IL-12, ainsi que sur la production d'IL-17 chez les LT CD4⁺ naïfs. Cependant, l'IL-23 a aussi un rôle majeur pour le maintien de la polarisation Th17 (Romagnani et al., 2009) et des fonctions effectrices (Mangan et al., 2006).

d) La sous-population des TH9

Le TH9 sont induits sous l'influence du TGF- β et de l'IL-4 (Fig. 9) (Dardalhon et al., 2008). Ces deux cytokines induisent respectivement l'expression des facteurs de transcription STAT-6, IRF4 et PU.1, indispensables à leur développement. IRF4 permet le maintien des

fonctions des Th9 (Gomez-Rodriguez et al., 2016). Cette protéine interagit avec PU.1 et induit la transcription d'IL-9. Les cytokines IL-9 et IL-12 sont caractéristiques des Th9 (Tan and Gery, 2012).

Les Th9 sont connus pour induire de fortes réponses proinflammatoires et semblent jouer un rôle dans les maladies auto-immunes, comme l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), les allergies et seraient impliqués dans l'immunité antitumorale (Kaplan et al., 2015). En effet, l'IL-9 agit comme un facteur de croissance et d'activation des mastocytes, mais favorise aussi l'expansion de certaines sous-populations de lymphocytes B.

e) La sous-population des Th22

Ce sous-type de cellules a été séparé des Th17 en 2009 (Duhen et al., 2009; Trifari et al., 2009). Les cellules de Langerhans ainsi que les Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes (pDC) du derme semblent permettre l'orientation des T CD4⁺ naïfs en Th22. Cette orientation se déroule en présence des cytokines IL-6 et TNF- α (Fig. 9). Cependant les mécanismes moléculaires impliqués ne sont encore pas clairement identifiés, néanmoins le facteur de transcription AhR (*Aryl hydrocarbon receptor*) semble indispensable à l'initiation de leur différentiation (Ouyang et al., 2011). Les Th22 synthétisent de l'IL-22, de l'IL-13, du TNF- α .

Les Th22 semblent être spécialisés dans l'homéostasie épithéliale, la cicatrisation et dans les pathologies inflammatoires de la peau et de l'estomac (Shabgah et al., 2017; Zhuang et al., 2014). Enfin les Th22 expriment des récepteurs de chimiokines impliqués dans la migration vers les tissus de la peau (CCR4 et CCR10) (Duhen et al., 2009).

f) La sous-population des Treg

Les T CD4⁺ naïfs peuvent se différencier en lymphocytes T régulateurs inductibles (iTreg ou pTreg) en présence de TGF- β . Cette cytokine induit l'expression transitoire de CD25 et du facteur de transcription *Forkhead box P3* (FoxP3) par les lymphocytes T CD4⁺ Foxp3⁻ (Chen et al., 2003). Cependant, FoxP3 peut aussi être exprimé par les lymphocytes CD4⁺ activés sans pour autant être lié à une action immunosuppressive de ces cellules (Kryczek et al., 2009a). Ces T activés expriment fortement CD127, permettant de les différencier des Treg qui l'expriment faiblement. De plus, en amont de l'exon 1 du gène FoxP3, les Treg présentent une déméthylation des motifs CpG, absente pour les T activés (O'Shea and Paul, 2010). Les iTreg sont induits en périphérie (Baecher-Allan et al., 2001), certainement à partir de T matures après une stimulation antigénique, en présence d'un environnement immunosuppressif créé par le TGF- β (Fig. 9) (Lafaille and Lafaille, 2009). Plusieurs types cellulaires pour les iTreg ont été

identifiés; les Tr1 FOP3⁻ et les Th3 FOXP3⁺. Le TGF- β va induire l'activation de trois facteurs de transcription, SMAD2, SMAD3 et SMAD4, qui activent l'expression de FoxP3 dans les Th3 (Takimoto et al., 2010). Les Tr1 synthétisent dans l'environnement de l'IL-10 (van Herk and te Velde, 2016), alors que les Th3, présents surtout dans l'intestin, participent à la tolérance vis àvis des antigènes oraux et sécrètent du TGF- β (Weiner, 2001).

Les Treg peuvent aussi avoir une origine thymique et sont alors appelés « naturels » (nTreg ou tTreg). Ils se caractérisent par une expression constitutive de FoxP3, d'Helios et de la neuropiline-1 (Weiss et al., 2012) et représentent 5 à 10% des CD4⁺ périphériques du sang chez l'homme (Baecher-Allan et al., 2001). L'expression de FoxP3 est maintenue dans les nTreg par le complexe FoxP3/Runx1, exprimé de façon constitutive.

Les Treg expriment aussi CTLA-4, *Glucocoticoid-Induced Tumor necrosis factor family Related gene* (GITR), TGF- β membranaire, PD-1, CD39 et CCR4 (Lafaille and Lafaille, 2009; Pere et al., 2012). Ces cellules ont un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie, la tolérance et le contrôle des réponses immunitaires aberrantes ou excessives (Sakaguchi et al., 1995, 2006).

Plusieurs mécanismes sont utilisés par les Treg pour jouer leur rôle d'immunosuppresseurs. Cette sous-population de lymphocytes T inhibe la prolifération et les fonctions effectrices d'autres cellules immunitaires. Les Treg peuvent agir par l'intermédiaire de leurs cytokines immunosuppressives, le TGF- β et l'IL-35 qui inhibent la prolifération des lymphocytes T (Collison et al., 2007), le TGF-β induit aussi l'expression de IDO par les DC (Pallotta et al., 2011). Enfin, l'IL-10 induit des DC tolérogènes (Steinbrink et al., 1997) et possède un grand rôle dans l'immunosuppression, en inhibant les Th1, les NK, les macrophages, en limitant ainsi les dommages cellulaires pouvant être induits lors d'une inflammation (Ouyang et al., 2011). Les Treg peuvent aussi induire la mort des cellules T notamment par la sécrétion de perforine et granzyme A (Grossman et al., 2004). Les Treg peuvent induire une suppression des lymphocytes T par l'induction d'une perturbation métabolique, passant par la répression de l'expression autocrine de l'IL-2. Les Treg entrent alors en compétition avec les lymphocytes T pour la fixation de cette cytokine (Pandiyan et al., 2007). Enfin, les DC peuvent voir leur maturation ainsi que leurs fonctions modulées par la fixation de CTLA-4 exprimé par les Treg, aux CD80 et CD86 des DC. Cette liaison induit la sécrétion d'IDO, qui lui-même induit la mort des lymphocytes T (Mellor and Munn, 2004). Les Treg peuvent aussi exprimer LAG-3 qui est capable de lier les molécules du CMH-II bloquant la maturation des DC (Liang et al., 2008). De plus, la diminution d'expression des molécules

de co-stimulation par les DC va aussi diminuer leur capacité à activer les T (Cederbom et al., 2000). L'activation de T naïfs va aussi être inhibée par la synthèse de la neuropiline-1, qui prolonge le contact entre Treg et DC immatures (Sarris et al., 2008). Les Treg peuvent agir au niveau de la synapse immunologique par la fixation de CTLA-4 au CD28, avec une meilleure affinité que CD80 et CD86, empêchant le signal de co-stimulation sur le T naïf (Yokosuka et al., 2010). Ainsi, la cellule naïve ne peut pas être activée de façon efficace et sa prolifération sera aussi inhibée.

g) La sous-population des Tfh

Les CD4⁺ naïfs s'orientent vers une polarisation T *follicular helper* (Tfh) après stimulation de leur TCR, en présence d'IL-6 et d'IL-21 (Fig. 9) (Nurieva et al., 2008). Cette population cellulaire est caractérisée par l'expression du facteur de transcription Bcl-6, les récepteurs CXCR5, CXCL13, PD-1, ICOS, mais aussi d'IL-4 et d'IL-21 (Kroenke et al., 2012). Le récepteur CXCR5 leur permet de migrer dans les zones folliculaires des organes lymphoïdes et la sécrétion des cytokines favorise la différenciation et la maturation des lymphocytes B. Il existe plusieurs sous types de Tfh, Tfh1, Tfh2, Tfh17 par analogie aux Th, suivant leur localisation, leur phénotype et leur fonction et il existe aussi des Tfh mémoires circulants (Ueno et al., 2015).

L'implication des Tfh dans la différenciation et la maturation des lymphocytes B peut être à l'origine de pathologies liées à ces cellules, telles que la lymphadénopathie angioimmunoblastique ou la croissance des lymphomes folliculaires B, mais aussi liées à des désordres allergiques (Varricchi et al., 2016).

Ces différentes sous-populations de CD4⁺ ne sont pas figées puisqu'il existe une plasticité de cette polarisation cellulaire influencée par les cytokines libérées dans l'environnement.

V) La plasticité des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

La polarisation de lymphocytes T CD4⁺ en l'une de ses sous-populations, comme Th1, Th2, ou Th9 a longtemps été considérée comme un processus irréversible (Mosmann and Coffman, 1989). Or, plusieurs équipes ont pu démontrer que les lymphocytes T CD4⁺, une fois différenciés, avaient la capacité de modifier leur phénotype et changer de sous-population CD4⁺ (Fig. 10) (Fang and Zhu, 2017; Murphy and Stockinger, 2010; O'Shea and Paul, 2010). En effet, ce phénomène de plasticité peut être expliqué par des modifications épigénétiques (Wilson et al., 2009), comme la méthylation de l'ADN, ainsi que l'acétylation des histones (Allan et al., 2012; Kanno et al., 2012). Un critère important pour cette reprogrammation est l'état de différenciation des CD4⁺, surtout pour les Th1 et Th2 (Murphy et al., 1996). En effet, lorsque les lymphocytes entrent en phase tardive de différenciation, la réorientation devient plus compliquée pour le lymphocyte.

Les cytokines sécrétées et les facteurs de transcription exprimés, comme T-bet pour Th1 et GATA-3 pour Th2, influencent la différenciation des CD4⁺ naïfs. La différenciation Th2 est inhibée par l'IFN- γ et la différenciation en Th1 par l'IL-4. Cependant, sous l'influence d'IL-4, les Th1 peu différenciés peuvent réorienter leur polarisation en Th2 (Zhu and Paul, 2010). La sous population de Th17 peut aussi se réorienter en Th1 ou Th2 (Lee et al., 2009), de même que les Treg en Th1 (Oldenhove et al., 2009) ou en Th17 (Yang et al., 2008). Enfin, le Tfh peuvent aussi devenir des Th1 ou Th2 en se reprogrammant (Lu et al., 2011), ou encore les Th2 peuvent aussi être réorientés en Th9 sous l'influence du TGF- β (Dardalhon et al., 2008).



Figure 10 : Plasticité des lymphocytes T CD4+ (d'après DuPage and Bluestone, 2016).

Ce phénomène dynamique, reflet d'une plasticité des CD4⁺, permet à ces souspopulations de s'adapter au mieux à leur environnement.

Chapitre 2 : L'immunosurveillance des tumeurs

Ces populations de cellules immunitaires peuvent détecter des modifications de certains gènes au sein des cellules du soi.

I) L'implication du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs

Différents arguments expérimentaux, à partir de modèles murins, mais aussi issus d'observations cliniques, appuient la théorie de l'implication du système immunitaire dans le contrôle du développement des tumeurs. Tout d'abord, une hausse de l'incidence des cancers a pu être observée dans des modèles murins immunodéficients. Ces souris peuvent être déficientes pour des gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative, comme *Signal Transducer and Activator of Transcription*-1 (STAT-1), indispensables aux cellules NK, B et T. D'autres modèles murins sont déficients en gènes RAG-1 et RAG-2 essentiels pour les récepteurs des lymphocytes T et B (Shankaran et al., 2001). Ces modifications génétiques peuvent cibler des molécules impliquées dans la communication de ces cellules immunitaires, comme l'IFN- γ ou la perforine (Dighe et al., 1994), pour lesquelles l'incidence des tumeurs spontanées ou induites est aussi augmentée.

Un déficit en lymphocytes T chez l'humain est en relation avec une augmentation des risques de développer un cancer viro-induit. En effet, cette immunodéficience peut être congénitale, comme la trisomie 21 caractérisée entre autre par un défaut en lymphocytes T fonctionnels, ou le cas de l'ataxie télangiectasie qui s'accompagne notamment d'hypoplasie thymique et de déficits en IgG. Ces deux pathologies sont associées à de forts taux de leucémies par rapport à la population globale. Le cas d'immunodéficience induite pour les personnes atteintes du VIH ou transplantées est également la cause d'une augmentation de l'incidence des cancers chez ces patients. Ils développent plus souvent des sarcomes de kaposi (dû à Herpès Virus Humain 8 HHV8), des lymphomes de Burkitt (dû à Epstein Bar virus, EBV), des cancers du col de l'utérus (dû à Human PapillomaVirus, HPV), ou encore des hémopathies comme le lymphome malin non hodgkinien. Des régressions de lymphomes non hodgkiniens ont été observées après l'arrêt d'immunosuppresseurs chez des patients transplantés. Cette régression renforce la relation entre le développement de ces cancers et l'immunosuppression. D'autres arguments cliniques sont en faveur de l'existence d'une réponse immunitaire antitumorale,

comme le développement de cancer, chez des patients receveurs d'une greffe d'organe, du même type histologique que le donneur en rémission au moment du don.

Cependant tous les cancers ne semblent pas être impactés au même niveau par un déficit immunitaire. En effet, l'incidence du cancer du sein par exemple, semble moins impactée par l'immunodéficience (Grulich et al., 2007).

II) La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs

En tout état de cause, malgré une longue période de controverse, l'implication du système immunitaire dans le contrôle du développement du cancer est désormais clairement établie. En 1891, W. B. Coley tente de traiter ses patients atteints d'un sarcome par streptococcus pyogenes. En effet, il avait établi une corrélation entre la régression de sarcomes osseux et la survenue de surinfection postopératoire par ce streptocoque pathogène. L'hypothèse avait été émise que la réponse inflammatoire secondaire à la surinfection pouvait contrôler la croissance tumorale. Puis plusieurs immunologistes se succédèrent pour étudier le lien entre système immunitaire et cancer.

Dès 1909, P. Ehrlich a émis l'hypothèse que le système pouvait reconnaitre et empêcher les cellules cancéreuses de proliférer, à partir d'un modèle murin de tumeur spontanée. Puis en 1957, F. M. Burnet et L. Thomas ont introduit le concept d'immunosurveillance des tumeurs (Burnet, 1957), appuyé par les expériences de rejet tumoral, réalisées par J. Foley en 1953, dans des souris greffées par des cellules tumorales préalablement éliminées. Cette théorie reconnait un rôle majeur du système immunitaire dans la reconnaissance, l'élimination des cellules cancéreuses, ainsi que dans le contrôle de leur prolifération. Dans les années 1990, l'émergence des modèles murins d'immunodéficience ont permis d'appuyer le rôle de l'immunité, en particulier adaptative avec les LT CD4⁺ et T CD8⁺ dans la reconnaissance et l'élimination des cancers (Dighe et al., 1994; Hung et al., 1998; Shankaran et al., 2001). L'idée que le système immunitaire n'est pas seulement impliqué dans la défense de l'hôte contre les cellules cancéreuses commence à émerger. En effet, le système immunitaire pourrait aussi moduler l'immunogénicité de la tumeur (Shankaran et al., 2001).

Ainsi, Schreiber et ses collègues développent cette idée avec la théorie de l'immunoédition des tumeurs (Fig. 11) (Dunn et al., 2002, 2004). Ces recherches démontrent un double effet sur le contrôle du développement des tumeurs, l'un permet de protéger l'organisme et l'autre conduit à une sélection des cellules tumorales pouvant échapper à

l'élimination. Cette théorie, aussi nommée la théorie des 3E, stipule que le système immunitaire interagit avec les cellules cancéreuses de façon dynamique, au travers de trois étapes (Fig. 11).



Figure 11: Le développement tumoral, l'immunosurveillance et théorie de l'immunoédition, d'après (Vesely et al., 2011).

Phase 1 : L'élimination des cellules tumorales immunogènes par les cellules immunitairesPhase 2 : L'équilibre entre l'élimination et la prolifération des cellules tumoralesPhase 3 : L'échappement de cellules tumorales au contrôle des cellules immunitaires

La première correspond à une phase d'élimination de la tumeur naissante, chez un hôte immunocompétent, par une coopération entre différents acteurs de l'immunité. Cependant, certaines cellules cancéreuses peuvent ne pas être éliminées à cette étape, sans doute dû à leur faible immunogénicité ou dû à un défaut du système immunitaire de l'hôte. Au cours d'une période variable pouvant aller jusqu'à plusieurs années, les cellules cancéreuses n'ayant pas été éliminées entrent en phase d'équilibre dynamique, durant laquelle l'édition de la tumeur se produit. Lors de cette phase, certaines cellules sont éliminées alors que celles ayant survécu à l'élimination prolifèrent. Les cellules tumorales subsistantes vont alors continuer à acquérir des mutations, conduisant à l'apparition de nouveaux clones tumoraux. Un environnement immunosuppressif va aussi se mettre en place autour de ces nouveaux variants tumoraux. La tumeur peut alors se développer et entrer en phase d'échappement, grâce à la mise en place de plusieurs mécanismes. Parmi eux, la perte d'expression des molécules de CMH, la création d'un environnement immunosuppressif, l'expression de molécules immunosuppressives (PD-L1, Galectine-9,...), modifications de l'antigénome. À partir de cette étape, le cancer peut être détecté chez le patient, ce qui laisse penser que le système immunitaire est dépassé et n'a plus de contrôle sur la croissance tumorale. Cet échappement tumoral est désormais reconnu en tant que caractéristique fondamentale des cellules tumorales (Fig. 12), "*Hallmarks of cancer*" (Hanahan and Weinberg, 2011).



Figure 12 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses, d'après (Hanahan and Weinberg, 2011).

III) Les antigènes de tumeurs

Les lymphocytes T peuvent s'activer lorsqu'ils détectent la présence de cellules de soi modifiées, par la présence d'antigènes de tumeurs présentés par des molécules du CMH. Ces modifications peuvent être impliquées dans la transformation cellulaire et induire un répertoire altéré de peptides présentés aux lymphocytes T. Ainsi, plusieurs antigènes de tumeurs ont été identifiés pour leur capacité à être reconnus par les T.

1) Le rôle des antigènes de tumeurs dans l'immunosurveillance

Après les expériences de Foley en 1953, l'équipe de Vose et Bonard, dans les années 1980, ont pu montrer le lien entre le rejet des cellules tumorales et le système immunitaire (Vose and Bonnard, 1982). Lors de cette étude, des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de tumeurs humaines et capables de lyser les cellules cancéreuses autologues ont été cultivés ex vivo. Les travaux de Thierry Boon et son équipe en 1991 ont démontré l'existence d'antigènes de tumeurs humains, reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ (van der Bruggen et al., 1991). Ensemble, ces données supportent l'idée que le système immunitaire adaptatif est capable de différencier les cellules tumorales des cellules saines, par la reconnaissance d'antigènes de tumeurs. En effet, l'immunosurveillance d'une tumeur non éditée a pu être attribuée à la présence d'antigènes tumoraux fortement immunogènes (Schreiber et al., 2012). Ainsi, le pilier central de la théorie de l'immunologiquement les cancers, en induisant la perte de ces antigènes tumoraux par la tumeur (Matsushita et al., 2012).

2) Les stratégies d'identification des antigènes de tumeurs

Alors que les études suggérant l'existence d'antigènes spécifiques de tumeurs ont été menées dès 1940 (Gross, 1943), il a fallu attendre 50 ans pour identifier les premiers antigènes de tumeur humains reconnus par les lymphocytes T (van der Bruggen et al., 1991).

Beaucoup d'études se sont tournées vers l'identification de cibles des lymphocytes T CD8⁺ qui sont les cellules cytotoxiques majoritaires dans le cancer. Tout d'abord des clones ont pu être isolés à partir de TIL CD8⁺ réactifs vis-à-vis d'antigène de tumeur (Topalian et al., 1989) ou à partir de stimulation in vitro de lymphocytes circulants par des cellules tumorales autologues (Boon et al., 1994; Van Eynde et al., 1989).

Le premier antigène de cancer humain ciblé par des CD4⁺ a été identifié en 1994 (Topalian, 1994). L'identification de peptides de tumeur présentés par le CMH-II représente un enjeu majeur dans le développement de stratégies d'immunothérapie efficace (Wang, 2001).

a) L'approche génomique

Dès 1991, l'équipe de Thierry BOON a pu identifier le premier antigène humain associé aux tumeurs, nommé MAGE-A1, en utilisant cette méthode. L'étude a porté sur des lignées cellulaires de mélanomes reconnues par un lymphocyte T CD8⁺ suggérant l'existence d'un antigène commun à toutes les lignées (van der Bruggen et al., 1991). Cette approche utilise une construction de banque d'ADNc synthétisée à partir d'ARNm isolés de tumeurs. Une lignée cellulaire (COS) est transfectée par des vecteurs d'expression contenant la banque d'ADNc, mais aussi l'ADNc codant pour les molécules du CMH-I du patient. Les antigènes tumoraux sont identifiés en utilisant les TIL spécifiques de la tumeur. Cette technique permet d'identifier les antigènes tumoraux immunogènes en passant par une étape de sélection des ADNc reconnus, correspondant aux peptides eux-mêmes reconnus par les lymphocytes T (Boon et al., 1992; De Plaen et al., 1997). Puis en 1994 Rosenberg et son équipe ont pu identifier le premier antigène de tumeur capable d'induire des réponses T CD4⁺ (Topalian, 1994).

Cependant, l'identification de peptides présentés par le CMH-II est plus compliquée avec cette méthode, car la transfection de banque d'ADNc dans des cellules cibles induit la traduction de protéines qui vont rarement suivre la voie de présentation par le CMH-II.

b) L'approche biochimique

L'approche biochimique correspond à l'identification des peptides naturellement présentés par les molécules du CMH-I en surface des cellules tumorales reconnus par les lymphocytes spécifiques. Les peptides sont élués par un choc acide des complexes peptide-CMH eux même isolés sur colonne par chromatographie à haute pression (HPLC), à partir de lysats cellulaires. L'immunogénicité de ces peptides est ensuite testée avec des lymphocytes T autologues. Les protéines correspondant aux peptides immunogènes sont ensuite identifiées par séquençage des peptides.

L'utilisation de cette méthode est particulièrement difficile pour identifier les peptides présentés par le CMH-II puisque s'il est exprimé par la cellule tumorale, son taux d'expression reste faible. En revanche, le fait que les peptides immunogènes identifiés soient présentés naturellement par le CMH des cellules tumorales, est un atout majeur, comme les peptides dérivés de p53 mutée (Houbiers et al., 1993) ou l'Antigène du Mélanome Reconnu par les lymphocytes T (MART-1) (Kawakami et al., 1994). De plus, cette stratégie a l'avantage de permettre l'identification des peptides associés aux tumeurs ayant subi des modifications post-traductionnelles, impossibles à identifier à partir de séquences d'ADN (Skipper et al., 1996).

c) L'approche sérologique

En 1997 une approche d'identification des antigènes de tumeurs a été publiée, l'approche sérologique serological analysis (SER) of autologous tumor antigens by *recombinant cDNA expression (EX) cloning* (SEREX) et immunoprotéomique (Türeci et al., 2005).

Cette méthode passe par la reconnaissance d'antigènes de tumeurs à partir d'anticorps circulants (Sahin et al., 1995). L'analyse sérologique est réalisée à partir de produits d'expression d'une banque d'ADNc tumoraux. Par contre, cette méthode permet majoritairement l'identification d'antigènes pouvant induire une réponse humorale qui se traduit par la sécrétion d'IgG (Comtesse et al., 2000).Toutefois des antigènes reconnus à la fois par les lymphocytes B et les Tfh peuvent être identifiés car ces cellules orientent la sécrétion d'IgG1, IgG2, IgG4, IgA ou IgE par les plasmocytes.

d) L'approche d'immunologie inverse

L'identification d'antigène de tumeur passe par une étape de sélection des antigènes de tumeur candidats, une étape de prédiction bio-informatique pour identifier des peptides potentiellement immunogènes, avant de tester le répertoire T in vitro. Plusieurs algorithmes ont été développés afin de prédire ces séquences peptidiques, à partir d'une séquence protéique. Ces algorithmes, comme Syfpeithi, sont basés sur les motifs de liaison du peptide au CMH, correspondant aux résidus d'ancrage et permettent de prédire la potentielle fixation du peptide d'intérêt au CMH-I (Rammensee and Singh-Jasuja, 2013). Des résidus secondaires sont impliqués dans la fixation du peptide au CMH et peuvent modifier la capacité de liaison des résidus d'ancrage (Ruppert et al., 1993). De plus, ces peptides sont classés suivant leur potentielle intensité de fixation, définie par le temps de demi-dissociation, correspondant au temps prédit pour lequel la moitié des peptides ne serait plus liée au CMH-I. L'algorithme Syfpeithi calcule une affinité de liaison en déterminant la capacité de chaque acide aminé à pouvoir lier la poche de fixation. Ces énergies de liaison calculées pour chaque peptide reflètent, lorsqu'elles sont additionnées, l'affinité de liaison du peptide pour le CMH-I (Parker et al., 1994). Cependant, cet algorithme ne tient pas compte de l'influence des acides aminés voisins sur l'énergie de liaison prédite. Ainsi, d'autre algorithmes, les réseaux de neurones artificiels, semblent être plus fiables. Par exemple NetMHC est une base de données qui rassemble des mesures de probabilité d'accroche entre un épitope et une molécule de CMH (Nielsen et al., 2010). Concernant le CMH-II, IEDB est le plus souvent utilisé et prédit aussi des séquences peptidiques qui potentiellement fixent le CMH-II. Toutefois, ces algorithmes ne garantissent pas l'immunogénicité des peptides prédits (Linnemann et al., 2015). Certes, l'induction de réponses immunitaires est corrélée avec l'augmentation de la stabilité des molécules CMH-I et -II, après la fixation des peptides (Germain, 1994; Rabinowitz et al., 1996), mais l'affinité des peptides pour les molécules du CMH n'est pas forcément en lien avec la stabilité de ces complexes.

Face aux divers facteurs pouvant influencer l'apprêtement, la présentation par le CMH ou même la reconnaissance des peptides par le TCR, plusieurs algorithmes prédictifs, autres que la prédiction de la liaison du peptide au CMH, ont été développés. En effet, ceux-ci déterminent le potentiel de chaque peptide au clivage de protéasome ou sa prise en charge par les protéines TAP pour être dirigé au RE (<u>http://www.mhc-pathway.net</u>) (Dönnes and Kohlbacher, 2005; Tenzer et al., 2005). Cependant, pour l'instant seuls les peptides pouvant lier le CMH-I peuvent être testés.

Ainsi, pour cette méthode d'identification des peptides par immunologie inverse, la capacité des peptides à stimuler les réponses immunitaires T doit être testée in vitro (Celis et al., 1994), à partir de lymphocytes T provenant soit de donneurs sains, soit de patients. Puis l'immunogénicité des peptides est confirmée à l'aide de clones et de lignées tumorales exprimant l'antigène identifié ou de CPA ayant internalisé l'antigène étudié.

Finalement très peu de peptides, issus notamment de la dégradation des protéines cytosoliques mais aussi exogènes, seront réellement présentés en surface cellulaire par les molécules du CMH (Yewdell and Bennink, 1999). Seuls les peptides ayant un motif particulier pourront être présentés, notamment par le CMH-I. Pour la plupart des CMH-I les acides aminés situés en position 2 et en dernière place semblent être importants pour la liaison (Rammensee et al., 1999). Cependant, les clones générés, notamment les CD8⁺ cytotoxiques spécifiques des épitopes identifiés par cette méthode, sont souvent incapables de reconnaitre directement les cellules tumorales (Ayyoub et al., 1999; Zaks and Rosenberg, 1998). Plusieurs raisons expliquent ce phénomène, comme la faible expression de l'épitope en surface (Dahl et al., 1996). Une autre explication est que le peptide pourrait subir des modifications post-traductionnelles (Kessler et al., 2001; Skipper et al., 1996), modifiant ainsi sa capacité à être présenté.

3) Les classes d'antigènes de tumeurs

Depuis la découverte du premier antigène de tumeur humain, l'émergence de nouvelles techniques a permis l'identification de centaine d'antigènes de tumeurs (Cheever et al., 2009; Vigneron et al., 2013). Bien que les antigènes soient de nature hétérogène, ils peuvent être divisés suivant leur profil d'expression en cinq groupes. Les antigènes associés aux tumeurs (TAA, pour *Tumor Associated Antigen*) sont des protéines normales du soi, non modifiées génétiquement, comprenant les cancer-germline ou cancer testis antigènes (CTA), les antigènes

surexprimés et les antigènes de différenciation. Puis il existe les antigènes viraux et les antigènes spécifiques des tumeurs (TSA pour *Tumor specific antigens*) correspondant aux néoantigènes (Coulie et al., 2014; Heemskerk et al., 2013).



Figure 13 : Quatre des cinq classes d'antigènes de tumeurs reconnus par les lymphocytes T (d'après Coulie et al., 2014)

a) Les cancer-testis ou cancer-germline

Ce groupe d'antigène est codé par des gènes dont l'expression est initialement silencieuse dans la majorité des tissus sains, mais se retrouve réactivée par des modifications épigénétiques. En effet, certaines régions des promoteurs sont riches en ilôts CpG, se retrouvent hyperméthylées dans les cellules saines, hormis les cellules germinales (testicules, ovaires) et tissus tropholastiques, entrainant l'extinction de ces gènes. Ce phénomène est alors inversé dans les cellules tumorales avec une hypométhylation de ces régions spécifiques (Sigalotti et al., 2004; Smet et al., 1999).

Le premier antigène de tumeurs reconnu par les lymphocytes T CD8⁺, MAGE-1 (Melanoma Antigen -1) a été identifié en 1991, à partir d'un patient atteint d'un mélanome (van der Bruggen et al., 1991). Ces antigènes ont été regroupés en superfamilles MAGE (Gaugler et al., 1994), contenant plusieurs familles MAGE-A, MAGE-B et MAGE-C (Meek and Marcar, 2012). D'autres antigènes ont été découverts, comme BAGE (B melanome antigen),(Boël et al., 1995) ou encore NY-ESO-1 (NewYork eosophage squamous cell carcinoma) (Chen et al., 1997; Zeng et al., 2000).

Ce groupe d'antigènes est une cible intéressante pour l'immunothérapie anticancéreuse, déjà testée dans lors d'essais cliniques (Baumgaertner et al., 2006; Boon et al., 2006; Carrasco et al., 2008). En effet, leur expression a pu être détectée dans de nombreux cancers, et restreinte dans les tissus sains aux sites immuno-privilégiés. Malgré tout, un essai clinique ciblant MAGE-A3 (Linette et al., 2013), entraine une toxicité cardiaque sévère. En effet, un peptide issu d'une protéine exprimée par les cellules cardiaques pouvait être reconnu par les T spécifiques de MAGE-3, correspondant à une réactivité croisée.

b) Les antigènes surexprimés

Ces antigènes sont surexprimés dans les cellules cancéreuses et peuvent être exprimés en très faible quantité dans quelques tissus spécialisés sains. Le taux d'expression basal de ces antigènes dans les cellules saines ne permet pas d'avoir une quantité suffisante d'épitopes présentés en surface par le CMH pour activer les réponses immunitaires (Lethé et al., 1998). En revanche, leur surexpression entraine une augmentation du nombre de complexes CMH-peptide présentés en surface cellulaire, permettant alors l'activation des réponses immunitaires antitumorales, puisque le seuil d'activation des T est dépassé (Ochsenbein et al., 2001; Zinkernagel and Hengartner, 2001).

Dans cette catégorie, l'antigène Her2/Neu (human epidermal growth factor-2 ou ErbB-2) (Fisk et al., 1995; Rongcun et al., 1999), est l'un des plus étudiés et surexprimés dans environ 25 à 30% des cas de cancer du sein invasif, de l'ovaire, colorectal, du pancréas et de la prostate (Pauletti et al., 1996; Press et al., 1997). En effet, la surexpression de HER2 permet d'augmenter la croissance cellulaire, la survie, l'adhésion, la migration et la différenciation des cellules tumorales. L'association de cet antigène de tumeur à un mauvais pronostic dans le cancer du sein invasif (Slamon et al., 1987) et son immunogénicité, démontrée par la découverte de T spécifiques infiltrant un carcinome ovarien (Fisk et al., 1995), en font une bonne cible d'immunothérapie antitumorale, notamment ciblée par l'Herceptine.

Un autre de ces antigènes surexprimés est hTERT (Meyerson et al., 1997). La sous unité catalytique de la protéine télomèrase est surexprimée dans près de 90% des cancers (Vonderheide et al., 1999) et est très faiblement exprimée dans les tissus sains (Shay and Bacchetti, 1997). Cette protéine impliquée dans l'immortalisation des cellules cancéreuses par l'élongation des télomères normalement réduits à chaque division cellulaire jusqu'à la sénescence des cellules. Des travaux ont démontrés que des cellules tumorales peuvent être reconnues et lysées par des CTL induits in vitro, à partir de peptides issus de hTERT (Ayyoub et al., 2001; Vonderheide et al., 1999). Un modèle murin de vaccination par la télomèrase

murine (mTERT), a permis d'identifier des réponses CD8⁺ spécifiques de cet antigène dans des tumeurs de différents types histologiques, sans toutefois induire d'autoimmunité contre les tissus sains (Nair et al., 2000). Mais un transfert adoptif de T spécifiques de la télomérase induit une lymphopénie des cellules B autoimmunes (Ugel et al., 2010).

Certains de ces antigènes ont une expression stabilisée et partagée par différents types histologiques de cancers, peuvent être impliqués dans l'oncogenèse et être immunogènes. Ces caractéristiques peuvent faire de ces antigènes surexprimés de bonnes cibles en immunothérapie antitumorale.

c) Les antigènes de différenciation

Les antigènes de différenciation sont exprimés par les cellules somatiques, suivant leur différenciation histologique, qu'elles soient saines ou tumorales. Cette catégorie comprend les antigènes comme Melan-A, MART-1 (Coulie et al., 1994), Tyrosinase (Brichard et al., 1993), GP100 (Bakker et al., 1994), l'Antigène Carcino-Embryogenic (ACE) (Horowitz et al., 1983), ou encore le *Prostate Specific Antigen* (PSA) (Kuriyama et al., 1980).

Des réponses T ont été identifiées à partir de lymphocytes infiltrants les tumeurs B (Kawakami et al., 1995) et périphériques chez des patients atteints de mélanomes B (Pinto et al., 2014). Il a été observé des régressions spontanées de mélanomes pour des patients atteints de vitiligo (Arpaia et al., 2006). La dépigmentation caractéristique du vitiligo correspond à une destruction des mélanocytes sains. Ces études confirment que les réponses immunitaires spécifiques des antigènes de différenciation par exemple mélanocytaires, peuvent avoir lieu dans un contexte normal ou tumoral (Duhra and Ilchyshyn, 1991). D'autres études ont identifié la présence d'un répertoire T chez des donneurs sains, permettant la reconnaissance de Melan-A ou MART1 (van Elsas et al., 1996; Pittet et al., 2001). Toutes ces données permettent d'observer la rupture d'une tolérance existante vis-à-vis de ces antigènes de différenciation, conduisant à l'émergence de réponses immunitaires dirigées contre des mélanomes. Toutefois, ces antigènes peuvent avoir une expression hétérogène au sein de la tumeur et instable au cours du temps, puisqu'ils ne sont pas indispensables à la survie des cellules tumorales.

Cependant, les TAA, que ce soit les CTA (Gallegos and Bevan, 2006) ou les antigènes de différenciation (Hengartner et al., 1988), sont des antigènes du soi pour lesquels le système immunitaire a développé une tolérance, afin d'éviter les risques d'auto-immunité. Les lymphocytes T très affins pour ces antigènes ont été éliminés lors de la sélection thymique, ce qui pourrait être un désavantage lors d'essais thérapeutiques. En effet, des essais cliniques

d'immunothérapies ciblant des CTA ont montré un faible taux de réussite, qui s'expliquerait par la sélection thymique et l'expression des cancer-testis par les cellules médullaires du thymus (Nicholaou et al., 2009).

d) Les antigènes viraux

Certains virus expriment des oncogènes viraux impliqués dans l'oncogenèse des cellules saines infectées, tel que le papillomavirus humain (HPV) à haut-risque carcinogène (HPV-16, -18, -45,...), mais aussi le virus d'Epstein Barr. Ces tumeurs viro-induites vont alors exprimer des antigènes viraux, qui seront identiques d'une tumeur à l'autre et seront potentiellement reconnus par des lymphocytes T. En effet, une immunisation avec des DC chargées par des peptides issus de protéines virales d'Epstein Barr, permet d'accélérer la régression tumorale nasopharyngée (Lin et al., 2002).

e) Les néoantigènes

Cette catégorie correspond à des antigènes exprimés uniquement dans les cellules cancéreuses, comme les antigènes issus de protéines aberrantes, ayant subi des modifications au niveau de l'ADN, de l'ARN messager (ARNm) et même des séquences en acides aminés (Fig. 14).

L'instabilité génique caractéristique des cellules tumorales peut conduire à l'apparition de protéines altérées (Hanahan and Weinberg, 2011), provenant de mutations génétiques ou de translocations chromosomiques. Ces modifications potentiellement immunogènes, correspondant aux néoantigènes, peuvent être reconnus par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (van den Broeke et al., 2006; Wölfel et al., 1995) comme certaines mutations de p53 ou KRAS identifiées dans plusieurs types de cancers (Gjertsen et al., 2001; Vierboom et al., 1997). En effet, Kreiter et son équipe ont démontré que certaines mutations peuvent être la cible de lymphocytes T antitumoraux CD4⁺ (Kreiter et al., 2015).



Figure 14 : Les types de mutations génomiques et de néoépitopes pouvant être reconnus par des TCR (d'après Türeci et al., 2016)

Ces mutations sont issues de mutations ponctuelles non silencieuses, de délétion, d'insertion, de modification de l'épissage ou après une fusion de deux gènes et peuvent toutes entrainer l'apparition de néoépitopes potentiellement immunogènes, pouvant lier le CMH-I (HLA-A, -B, -C) ou le CMH-II (HLA-DP, -DQ, -DR).

Les mutations de l'ADN peuvent être ponctuelles (missense mutation), des modifications du cadre ouvert de lecture, un allongement de la séquence codante (nonstop mutation), des insertions, des délétions ou des translocations chromosomiques (Fig. 14) (Heemskerk et al., 2013). Concernant les mutations ponctuelles, la seule modification d'une base peut entrainer la modification d'un acide aminé au sein de la protéine, ce sont les mutations par substitution et plus précisément les non silencieuses (ou *non silent missense mutations*). Ce type de mutation peut être à l'origine de deux types d'épitopes pouvant induire des réponses immunitaires. D'une part, la séquence en acide aminé modification de l'acide aminé d'ancrage du peptide aux molécules du CMH, on parle alors de néoagrétope (Fig. 15). D'autre part, la modification d'une séquence en acides aminés d'un épitope déjà présenté par le CMH, qu'il soit reconnu ou non par les TCR des lymphocytes T, est un néoépitope (Fig. 15). Il a été

démontré que les néoagrétopes étaient plus immunogènes que les néoépitopes (Duan et al., 2014), cependant d'autres études ne montrent aucune différence en termes de prédiction.



Figure 15: La liaison de peptide au CMH et au TCR suivant la modification de résidus d'ancrage ou de contact (d'après Fritsch et al., 2014a)

Le changement du cadre ouvert de lecture peut aussi conduire à la synthèse d'une nouvelle séquence d'acides aminés, comme pour le gène GP75 (Wang et al., 1996), pouvant induire une réponse immunitaire spécifique de ces néoantigènes. En effet, le nombre de framshift est corrélé au nombre de CD8⁺ et CD3⁺ dans le microenvironnement tumoral des CRC MSI (Maby et al., 2015a, 2015b; Mlecnik et al., 2016).

De plus, certaines mutations ont lieu dans des gènes comme des proto-oncogènes cellulaires, des gènes suppresseurs de tumeur ou encore impliqués dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Les protéines issues de ces gènes mutés peuvent acquérir un rôle protumoral, comme la protéine β-catenine, impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Wang et al., 1996), ou le gène CASP-8 codant la procaspase-8 impliquée dans l'induction de l'apoptose (Mandelboim et al., 1994). Il en est de même pour les protéines de la voie des MAP-Kinases impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que la survie, la prolifération, la différenciation, la mobilité et le métabolisme. Les cellules cancéreuses ont très souvent une activation constitutive de cette voie, suite à une ou plusieurs mutations, avec notamment le gène B-RAF muté dans 50 à 60% des cas de mélanomes (Davies et al., 2002). Des mutations notamment dans les gènes B-RAS et CDKN2A ont pu être identifiées et sont connues pour coder des protéines mutées elles-aussi impliquées dans l'oncogenèse (Huang et al., 2004). Ces gènes mutés présentent donc une plus forte probabilité de conservation au cours de l'évolution de la tumeur, puisqu'ils paraissent indispensables ou apportant au moins un avantage pour la survie de ces cellules. D'autres modifications peuvent avoir lieu, non pas sur les séquences d'ADN mais au niveau de l'ARN messager (ARNm). En effet, un néoépitope peut aussi avoir pour origine un épissage alternatif de l'ARNm (Lupetti et al., 1998). Ainsi, des néoantigènes peuvent apparaitre suite par exemple à la transcription d'introns, tels que les gènes MUM-1, NA17-A et Delta CD20 (Coulie et al., 1995; Guilloux et al., 1996; Vauchy et al., 2015) ou du brin dit « non sens » comme pour RU2AS (Van Den Eynde et al., 1999).

De plus, des modifications post-traductionnelles peuvent aussi induire la formation de néoantigènes, comme l'épissage peptidique réalisé par le protéasome. Cet épissage protéique correspond à l'association de deux extrémités d'un long peptide au niveau de l'extrémité C-ter pour l'une et l'extrémité N-ter pour l'autre, après l'excision de la partie intermédiaire, comme la protéine Fibroblast Growth Factor-5 (FGF-5) dans le cancer du rein (Hanada et al., 2004). Une autre modification post-traductionnelle est la phosphorylation aberrante des protéines qui est due au dérèglement des kinases dans les cellules cancéreuses. Ces protéines hyperphosphorylées peuvent être dégradées en peptides hyperphosphorylés, comme un peptide issu de la protéine hyperphosphorylée muddled meiosis 2 (MUM2), isolé de lignées de carcinomes (Zarling et al., 2000) Ces résidus phosphate induisent une augmentation de la stabilité des peptides liés au CMH-I (Mohammed et al., 2008; Zarling et al., 2000, 2006) et au CMH-II (Li et al., 2010). Des études ont pu identifier des peptides hyperphosphorylés immunogènes, présentés par les molécules HLA-A*0201 et HLA-B*07 :02 dans des cas de lymphomes et de leucémies (Cobbold et al., 2013). Et enfin, la glycosylation des protéines, un autre évènement de maturation post-traductionnelle, peut aussi être dérégulée dans les cellules cancéreuses. Les conditions de l'environnement cellulaire vont pouvoir induire des modifications du panel de protéines glycosylées, modifiant ainsi leurs propriétés, en jouant sur la mobilité des cellules, leur adhésion, migration, invasion, mais pouvant ainsi créer de nouveaux épitopes glycosylés potentiellement immunogènes (Ono and Hakomori, 2003).

Dès 1988, de nombreuses expériences ont conduit à l'identification de l'existence de néoantigènes immunogènes dans différents modèles murins, à partir par exemple de mutations induites par un agent mutagène (De Plaen et al., 1988), ou de souris vaccinées par des cellules tumorales leur conférant une protection immunitaire face à une seconde greffe par les mêmes cellules tumorales (Matsushita et al., 2012). Ainsi, l'existence d'une reconnaissance des cellules tumorales spécifiques de chaque lignée, permettant de contenir la croissance tumorale avait depuis plusieurs années été démontrée dans les modèles murins (Foley, 1953; Gross, 1943; Old, 1982). Ces avancées ont aussi permis d'identifier des agents mutagènes, comme les UV responsables de la formation de TSA reconnus par le système immunitaire (Dubey et al., 1997;

Monach et al., 1995). Il fallut attendre 1995 pour identifier le premier néoépitope humain, qui est issu d'une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la protéine kinase cycline dépendante 4 (CDK4) mutée R24C, qui rend le peptide beaucoup plus immunogène (Wolfel et al., 1995). Récemment, un néoantigène issu de MUC16 a même été identifié pour être associé à une meilleure survie pour les patients atteints d'un cancer du pancréas (Balachandran et al., 2017).

L'un des principaux défis en immunothérapie antitumorale est l'identification de cibles antigéniques immunogènes spécifiques des tumeurs. Ainsi, les néoantigènes, dont les antigènes issus de mutations non silencieuses, sont des candidats intéressants pour l'immunothérapie. En effet, le répertoire des cellules T vis-à-vis de ces néoantigènes spécifiques des cellules tumorales n'est pas restreint par la tolérance au soi et le risque de réponse ciblant des cellules saines est donc très faible. Toutefois, l'utilisation des TSA en immunothérapie nécessite la mise en place d'un traitement personnalisé et individuel, puisque dans la majorité des cas ces néoantigènes sont privés, propres à chaque individu et à chaque tumeur (Wang et al., 1999; Lennerz et al., 2005; Takenoyama et al., 2006; Carreno et al., 2015; Łuksza et al., 2017). Cette stratégie nécessite une étape d'identification de protéines mutées, phosphorylées ou glycosylées au sein de la tumeur de chaque individu.

Plusieurs travaux ont démontré une forte influence du nombre de mutations présentes dans la tumeur (Rizvi et al., 2015; Snyder et al., 2014), mais aussi leur répartition au sein des tumeurs (McGranahan et al., 2016), dans l'efficacité de l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre CTLA-4 et PD-L1.

IV) Les critères de sélections d'un antigène de tumeur

La grande hétérogénéité des antigènes de tumeurs est l'une des principales difficultés pour les immunologistes qui tentent d'identifier de nouvelles cibles d'immunothérapie antitumorale efficace.

1) L'antigène de tumeur dit « idéal »

Les antigènes de tumeurs ne sont pas tous égaux quant à leur efficacité en tant que cible du système immunitaire.

Cheever et son équipe ont regroupé des critères précis afin de prioriser les antigènes pouvant potentiellement être ciblés par une immunothérapie (Cheever et al., 2009). Ces critères

permettent d'identifier et de classer les « antigènes de tumeur idéaux » (Fig. 16). Quelques-uns de ces critères sont la fonction biologique, l'immunogénicité, la spécificité, le rôle dans l'oncogenèse, ou encore par exemple le niveau d'expression.



Figure 16 : Le poids de chaque critère identifié pour définir un antigène dit "idéal" (d'après Cheever et al., 2009)

Les gènes impliqués dans l'oncogenèse sont souvent ciblés en thérapie antitumorale. Néanmoins, des gènes n'étant pas impliqués dans ce phénomène peuvent être associés à un mauvais pronostic et par conséquent pourraient être des cibles intéressantes. Ce critère pronostique semble être plus important à prendre en considération que l'oncogénicité (Hasegawa et al., 2011; Nardiello et al., 2011).

L'immunogénicité des peptides est l'un des facteurs les plus importants pour déterminer si un antigène de tumeur constitue une bonne cible thérapeutique. Plusieurs moyens sont mis en œuvre pour augmenter l'immunogénicité des peptides comme la modification de la séquence en acides aminés permettant d'augmenter la capacité de fixation du peptide au CMH (Berzofsky et al., 2012).

La liste établie par Cheever et son équipe permet de classer les antigènes selon leur potentiel intérêt thérapeutique (Cheever et al., 2009). Elle n'est cependant ni exhaustive, ni fixe, mais reste une aide pour appuyer l'intérêt de cibler un antigène particulier. En effet, plusieurs critères de grande importance émergent peu à peu des études et doivent être pris en considération. C'est le cas par exemple de l'hétérogénéité tumorale (Gerlinger et al., 2012; de Bruin et al., 2014; McGranahan et al., 2016), les modulations d'expression des antigènes, consécutives à des modifications génétiques ou épigénétiques, les effets immunomodulateurs des traitements (Sorbye and Dahl, 2004), les similarités entre des peptides issus d'antigènes de tumeur et d'autres antigènes pathogènes comme des antigènes bactériens (Linette et al., 2013).

L'antigène dit idéal ne sera pas idéal pour toutes les cellules tumorales, ni pour chaque patient. L'ensemble des cellules tumorales sont génétiquement différentes, que ce soit au sein d'une même tumeur ou entre les tumeurs primaires et métastatiques, au sein d'un individu ou entre plusieurs. Le choix de l'antigène ciblé par une immunothérapie est primordial et peut se révéler être difficile à faire, notamment par la complexcité du répertoire antigènique (Vacchelli et al., 2013a, 2013b), modulé en fonction des traitements antitumoraux.

2) L'hétérogénéité tumorale

Les travaux d'Alexandrov en 2013 ont apporté une plus grande visibilité sur le taux de mutations, autrement dit la charge mutationnelle, dans plusieurs types de cancers (Alexandrov et al., 2013). Cette charge mutationnelle peut s'expliquer par le fait que certains types cellulaires sont exposés pendant une longue période et de façon répétée à des agents mutagènes qui conduisent à la transformation cellulaire, comme les carcinogènes du tabac ou les rayons ultraviolets. Toutefois, les mutations retrouvées dans la tumeur primaire ne reflètent pas toujours exactement celles des métastases ou des sites de rechute, puisque chaque tumeur et chaque région d'une tumeur possède sa propre évolution (de Bruin et al., 2014; McGranahan et al., 2016; Nik-Zainal et al., 2012). Cette différence, au point de vue génétique, participe à l'hétérogénéité intra tumorale (ITH intra tumor heterogeneity). L'existence d'une ITH due à des modifications épigénétiques a aussi pu être identifiée et serait notamment induite par des variations de méthylation de l'ADN (Mazor et al., 2016). Cette ITH épigénétique est en miroir de l'ITH due aux mutations codantes de l'ADN dans les gliomes (Mazor et al., 2015), les cancers de la prostate (Aryee et al., 2013) et les carcinomes squameux de l'œsophage (Hao et al., 2016).

Un ordre d'apparition des mutations peut être établi, suivant leur distribution au sein des tumeurs, créant un véritable arbre phylogénétique des mutations reflétant l'évolution du cancer d'un individu. En effet, des mutations peuvent avoir lieu à différents temps et sites de la tumeur et sont alors considérées comme clonales ou sous-clonales (Uchi et al., 2016). Les mutations retrouvées dans l'ensemble des cellules tumorales d'un individu constituent le tronc commun des modifications génétiques de ce cancer. Les branches sont formées par les sous-populations ou sous-clones de cellules tumorales (Gerlinger et al., 2012; Johnson et al., 2014). Ces mutations peuvent être dues, par exemple, à un système de réparation de l'ADN inefficace, comme l'inactivation du mécanisme de *mismatch repair* (MMR), qui est associé à de fortes charges mutationnelles mais aussi de meilleur pronostic (Lee and Le, 2015). De plus, certains agents chimiques, utilisés en thérapie antitumorale, ont une action mutagène qui peut aussi être
impliquée dans cette diversité. Des glioblastomes de bas grade, faiblement mutés, peuvent présenter des sous-clones tumoraux présentant un charge mutationnelle élevée après traitement par des agents alkylants (Johnson et al., 2014), connus pour être mutagènes (Nik-Zainal et al., 2012; de Bruin et al., 2014; McGranahan and Swanton, 2015). En revanche, certaines chimiothérapies peuvent induire l'apparition de mutations, dites sous-clonales, qui participent à l'augmentation de la charge mutationnelle et qui est souvent enrichie chez des mauvais répondeurs (McGranahan et al., 2016). Mc Granahan et son équipe ont pu démontrer que des populations des lymphocytes T infiltrants la tumeur, CD8⁺ PD1+, étaient spécifiques de néoantigènes dans des cas de cancer du poumon non à petites cellules. Ils ont aussi pu identifier des réponses immunitaires spécifiques de néoantigènes clonaux pour des patients ayant des bénéfices cliniques à long terme.

Les protéines de la famille APOBEC, pour *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like*, sont aussi connues pour être associées à un taux de mutations élevé lorsqu'elles sont elles-mêmes mutées, comme dans les cancers de la vessie et bronchique non à petites cellules (CBNPC) (de Bruin et al., 2014; McGranahan and Swanton, 2015). Les protéines de cette famille sont des cytidines désaminases et catalysent le changement d'une cytosine (C) en uracile (U), sur des polynucléotides ARN ou ADN. Ces mutations entrainent la création de sous-clones tumoraux, donnant naissance à de nouvelles branches au point de vue de l'évolution de la tumeur, notamment dans l'adénocarcinome du poumon, de l'œsophage, de la tête et du cou ou encore les cancers du sein HER2 (de Bruin et al., 2014; McGranahan and Swanton, 2015; Rosenthal et al., 2016).

La plupart des modifications génétiques sont propres à un individu et sont considérées comme privées (Stratton, 2011). Une fraction de ces modifications géniques est néanmoins partagée par différents cancers telles que les translocations chromosomiques BCR-Abl ou Tel-AML retrouvées dans certaines leucémies (Greco et al., 1996). Les mutations peuvent être impliquées dans l'oncogenèse, caractérisées alors d'essentielles au fonctionnement des cellules tumorales et sont donc appelées promotrices ou « *driver* ». D'autres sont accumulées comme simples mutations passagères, ou « passenger ».

L'histoire naturelle du cancer du côlon correspond à une succession d'étapes, clairement identifiées (Fig. 17), pour lesquelles l'acquisition d'une mutation dans des gènes particuliers

induit l'apparition d'une nouvelle caractéristique indispensable pour la transformation cellulaire.



Figure 17 : Le modèle de modifications génétiques séquentielles, impliquées dans l'oncogenèse d'un cancer du côlon métastatique (d'après ©Terese Winslow 2005).

Tout commence par une mutation permettant une perte de fonction de la protéine APC (*adenomatous polyposis coli*) conduisant à l'augmentation de la prolifération cellulaire (Kinzler and Vogelstein, 1997). Ce phénomène de prolifération intense favorise l'apparition de nouvelles mutations comme dans le gène KRAS, augmentant encore la vitesse de prolifération des cellules. Enfin, les cellules doublement mutées vont avoir plus de chance d'acquérir une mutation au niveau du gène PI3KCA, qui conduit à la migration et l'invasion des tissus voisins. Ces mutations sont considérées comme promotrices (Fig. 17). De plus, elles sont conservées dans l'ensemble des cellules cancéreuses tout au long de l'évolution de la tumeur, puisqu'elles ont lieu très tôt dans l'histoire des cellules cancéreuses, lors de la transformation.

De façon plus générale, il est difficile d'identifier la qualité de la mutation somatique, à savoir si celle-ci est promotrice ou passagère. De plus, il existe une différence entre un gène *driver* et une mutation *driver* dans un gène. Un gène *driver* peut contenir une mutation *driver*, mais aussi passagère. Par exemple, le gène APC est un gène driver, mais seules des mutations qui ont lieu dans les 1600 derniers acides aminés en N-ter et qui induisent une protéine tronquée, sont des mutations *driver* (Vogelstein et al., 2013).

Les sauts évolutionnaires, induits par des mutations ou altérations chromosomiques drivers, sont donc impliqués dans l'ITH (Notta et al., 2016) et la résistance aux traitements antitumoraux (Greaves, 2015). Les mutations au sein des cellules cancéreuses ont des impacts sur la réponse des patients aux traitements et donc sur les potentielles rechutes. En effet, il a été

démontré dans la LLC, que la présence de mutations « drivers » sous-clonales est associée à une diminution de la survie sans rechute des patients (Landau et al., 2013). De plus, nombre de copie des gènes est aussi important à prendre en considération pour étudier l'ITH, puisque l'instabilité chromosomique caractéristique des cellules tumorales peut induire une perte de matériel génétique (McPherson et al., 2016; Murugaesu et al., 2015).

Plusieurs études ont pu démontrer que la charge mutationnelle est associée à une meilleure efficacité des inhibiteurs des immune checkpoints, comme l'anti-CTLA-4 dans le mélanome (Snyder et al., 2014; Van Allen et al., 2015) ou anti-PD-1 dans le CBNPC (Rizvi et al., 2015). Les antigènes résultant de mutations somatiques non silencieuses peuvent donner naissance à des néoépitopes, comme par exemple, un peptide muté issu de la protéine CDK4 (Wolfel et al., 1995). La modification d'un seul acide aminé induit non seulement la reconnaissance de ce peptide muté par les lymphocytes T cytotoxiques d'un patient atteint d'un mélanome, mais aussi l'impossibilité pour CDK4 de fixer son inhibiteur, p16 INK4a, activant donc le cycle cellulaire (Wolfel et al., 1995). De plus, quelques mutations drivers et partagées peuvent être reconnues par le système immunitaires, c'est le cas de certaines mutations immunogènes de BRAF (Somasundaram et al., 2006) ou RAS (Linard et al., 2002). La reconnaissance d'antigènes de tumeurs par les lymphocytes T pourrait passer par le biais des néoantigènes qui sont spécifiques des cellules tumorales, alors que des agents mutagènes ou l'instabilité génique induisent de nouvelles mutations. En revanche, de forts taux de néoantigènes clonaux et un faible taux de néoantigènes sous-clonaux semblent apporter de meilleurs bénéfices aux patients (McGranahan et al., 2016).

Différents critères sont donc importants à étudier pour choisir un antigène cible d'une immunothérapie. L'efficacité de ce traitement peut être influencée par l'expression de l'antigène, partagée ou privée, son taux d'expression, ainsi que le fait que l'épitope puisse être présenté par plusieurs HLA différents, dit « *promiscuous* » (Strausberg et al., 2004), mais aussi par le microenvironnement tumoral.

Chapitre 3 : Les réponses immunitaires T antitumorales et leurs modulations

La coopération des différents types cellulaire de l'immunité est indispensable à la mise en place d'une réponse efficace. Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle crucial dans l'établissement de réponses antitumorales, mais les découvertes sur ce sujet sont tout de même moins avancées que pour les T CD8⁺.

Le microenvironnement tumoral, tant au niveau cellulaire que moléculaire, impacte majoritairement l'évolution du cancer et l'infiltrat tumoral influe le pronostic des patients atteints de cancers (Fridman et al., 2012; Galon et al., 2013; Powrie and Maloy, 2003).

I) Le rôle des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de tumeurs

L'effet cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs est l'une des fonctions principales du système immunitaire adaptatif contre les tumeurs. Ce rôle majeur a bien été démontré dans des modèles expérimentaux murins, ainsi que dans de nombreuses observations cliniques chez l'homme (Mackensen et al., 1994; Mandelboim et al., 1994). Les lymphocytes T CD8⁺ activés peuvent utiliser deux mécanismes en vue de lyser la cellule cible et d'induire l'apoptose; par la sécrétion de perforine et de granzymes (Pasternack et al., 1986; Podack et al., 1985) ou par l'expression de FasL (Waterhouse et al., 2006).

De plus, un fort infiltrat tumoral de lymphocytes T CD8⁺ est associé à un meilleur pronostic pour les patients (Fridman et al., 2012). En effet, une fois dans le microenvironnement tumoral, les cytokines sécrétées par les CD8⁺ effecteurs, comme l'IFN- γ , le TNF- β et le TNF- α , vont participer à la création d'un environnement favorable aux réponses immunitaires antitumorales.

II) Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de tumeurs

Les lymphocytes CD4⁺ ont la capacité d'initier ou d'inhiber les réponses immunitaires antitumorales. Ainsi les CD4+ peuvent être antitumoraux, comme les Th1, ou pro-tumoraux, comme les Th2 ou Treg. D'autres, en revanche ont un rôle encore controversé, comme les Th9, Th17, Th22 et Tfh (Gerloni and Zanetti, 2005; Knutson and Disis, 2005).

1) L'expression des molécules du CMH de classe II par les tumeurs

L'expression des molécules de CMH-II est initialement limitée aux CPA, mais peut aussi être réalisée par les cellules tumorales, dans certaines conditions, comme un environnement riche en IFN- γ (Park et al., 2017). Cependant, il existe plusieurs possibilités expliquant la préparation et la présentation de peptides endogènes, par les molécules du CMH-II, notamment l'autophagie qui est activée en conditions de stress cellulaire (Dengjel et al., 2005; Klionsky and Emr, 2000).

Néanmoins, l'expression des molécules du CMH-II par les cellules tumorales reste faible, de même que l'expression des molécules de costimulation à leur surface. La faible quantité d'expression de ces deux types moléculaires limite l'activation des CD4⁺ par les cellules tumorales qui influencent pourtant fortement le devenir des cellules cancéreuses par leur intervention dans la composition du microenvironnement tumoral et les réponses antitumorales (O'Shea and Paul, 2010).





a) Les lymphocytes T de type Th1

Le rôle antitumoral de la sous-population de Th1 est désormais clairement identifié (Fridman et al., 2012; Kim and Cantor, 2014). Les Th1, sécréteurs d'IL-2, de TNF- α et d'IFN-

 γ , coordonnent les réponses immunitaires cellulaires antitumorales par l'intermédiaire des cellules dendritiques, CD8⁺, NK et macrophages de type 1 (M1) (Kennedy and Celis, 2008; Pardoll and Topalian, 1998.)

Les Th1 agissent sur les CD8⁺ en apportant une aide pour la genèse et l'augmentation des réponses des CD8⁺ cytotoxiques (Bourgeois et al., 2002; Shafer-Weaver et al., 2009). Tout d'abord, les Th1 vont exprimer en surface CD40L de façon transitoire après avoir été activés par le signal 1 et le signal 2. La liaison CD40L/CD40, ainsi que l'IFN- γ sécrété par les Th1, favorisent la maturation des DC en induisant l'augmentation de molécules de CMH-I et –II, des molécules de costimulation (CD80/86), mais aussi d'IL-12 (Snijders et al., 1998) (snijers et al. 1998). L'induction de la sécrétion de chimiokines telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11 par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et par les cellules épithéliales tumorales elles-mêmes, sous l'influence de l'IFN- γ , va permettre le recrutement des CD8⁺ cytotoxiques au site tumoral (Bos and Sherman, 2010).

Une fois arrivés dans l'environnement tumoral, les fonctions et la persistance des CD8⁺ sont favorisées par l'IFN-y et l'IL-2 sécrétés par les Th1. L'IL-2 contribue à la protection des CD8⁺ contre l'apoptose en leur transmettant un signal de survie et favorise la génération d'une réponse primaire efficace des CD8⁺ effecteurs, empêchant leur anergie (Bos and Sherman, 2010). Même s'il a déjà été démontré que les T CD8⁺ fortement activés par la liaison d'un complexe peptide-CMH au TCR avec une forte affinité, pouvaient sécréter eux-mêmes de l'IL-2, s'affranchissant ainsi des CD4⁺ pour la phase d'initiation, ce phénomène n'a pu être observé dans un contexte tumoral. Les Th1 peuvent donc se révéler indispensables aux CD8⁺, qu'ils soient effecteurs ou mémoires, dans un contexte antitumoral. Cependant, il a été démontré qu'en absence de CD8⁺, les CD4⁺ spécifiques de la tumeur pouvaient tout de même induire une régression complète de la tumeur (Cohen et al., 2000). En effet, les Th1, par l'intermédiaire du TNF- α et de l'activation des voies passant par les récepteurs de mort, peuvent avoir une action cytotoxique directe sur les cellules cancéreuses (Kim and Cantor, 2014; Zanetti, 2015). Cette cytokine permet aussi d'augmenter la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose, en induisant une surexpression des caspases et des récepteurs de mort (TRAIL et FAS) (Takeda et al., 2002; Thomas and Hersey, 1998a, 1998b).

L'IFN- γ sécrété par les Th1 a un rôle majeur dans l'immunité antitumorale, démontré dans un modèle murin déficient pour cette cytokine ou pour son récepteur, qui présente une augmentation de la fréquence d'apparition de cancers chimioinduits (Kaplan et al., 1998) et spontanés (Street et al., 2002). L'IFN- γ peut agir à différents niveaux. Il peut activer les DC au

site tumoral qui vont elles-mêmes induire l'activation de CD8⁺ effecteurs capables de lyser les cellules tumorales (Palucka and Banchereau, 2012). De plus l'IFN- γ va pouvoir recruter et activer les macrophages M1 antitumoraux et les cellules NK pouvant, elles aussi, utiliser leur cytotoxicité contre les cellules cancéreuses (Bos and Sherman, 2010; Corthay et al., 2005). L'IFN- γ induit la synthèse de monoxyde d'azote (NO), d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou azotées par les macrophages impliqués dans la réponse antitumorale (Hung et al., 1998). L'IFN- γ a une action antiangiogénique, puisqu'elle permettrait la destruction de vaisseaux sanguins irriguant la tumeur (Mumberg et al., 1999; Qin and Blankenstein, 2000), mais elle pourrait aussi permettre l'inhibition de la néoangiogenèse tumorale (Coughlin et al., 1998). En revanche, des effets contradictoires de l'IFN- γ ont été mis en évidence favorisant la migration et la fonction des Treg, dérivant du thymus et impliqués dans le développement tumoral (Campbell and Koch, 2011), dans un contexte de réponse Th1 (Koch et al., 2009). Alors que l'équipe de Schreiber et Ley a démontré que l'axe IL-12/IFN- γ supprimait la prolifération des Treg et leur capacité à promouvoir la croissance tumorale (Cao et al., 2009).

De façon plus globale, plusieurs études ont pu mettre en évidence que la présence de Th1 dans l'infiltrat tumoral était de bon pronostic pour les patients dans différents types de cancers (Fridman et al., 2012; Pagès et al., 2009; Tosolini et al., 2011).

b) Les lymphocytes T de type Th9

Les Th9 ont de façon générale une activité pro-inflammatoire, permise par l'effet stimulant de l'IL-9 sur les mastocytes et de l'IL-4 sur la production d'IgE, IgG, mais aussi sur l'expansion des lymphocytes B. Schmitt et Bopp ont pu démontrer l'implication des Th9 et de l'IL-9 dans les réponses antitumorales (Lu et al., 2012; Purwar et al., 2012; Schmitt and Bopp, 2012; Végran et al., 2015) en favorisant notamment la toxicité des T CD8⁺ (You et al., 2017). Cependant, l'IL-9 pourrait avoir un effet stimulant des fonctions immunosuppressives des Treg (Elyaman et al., 2009).

c) Les lymphocytes T de type Th2

La polarisation Th2, induite par l'IL-4 est plutôt associée à la croissance tumorale avec cependant des rôles ambivalents (De Monte et al., 2011). Les cytokines comme l'IL-4 et IL-10 principalement synthétisées par les TH2 et les Treg vont influencer les réponses immunitaires. En effet, des injections d'IL-4 ou de Th2 à des souris immunocompétentes greffées par une lignée de mélanome B16, favorisent l'apparition de métastases pulmonaires (Kobayashi et al., 1998). De plus, de forts taux d'IL-4 et de Th2 ont été découverts dans le sang de patients atteints

de cancers colorectaux ou de la vessie (Agarwal et al., 2006; Kanazawa et al., 2005), mais aussi des Th2 spécifiques de MAGE-6 chez des patients en progression d'un mélanome ou d'un cancer du rein (Tatsumi et al., 2002).

À l'inverse, il a été démontré dans un modèle murin immunocompétent de greffe tumorale B16, que des Th2 pouvaient participer à l'élimination des métastases pulmonaires en ciblant l'antigène Ovalbumine, par l'intermédiaire de chimiokines sécrétées par les éosinophiles (Mattes et al., 2003) et potentiellement des cellules NK (Kitajima et al., 2011). Des injections d'IL-4 peuvent entrainer une augmentation des macrophages, des neutrophiles, mais aussi des lymphocytes (Modesti et al., 1993; Tepper et al., 1992). De plus, cette cytokine possède des propriétés anti-angiogéniques (Volpert et al., 1998). Un infiltrat riche en Th2 dans des lymphomes de hodgkin ou dans le cancer du sein, serait corrélé à une meilleure survie (Ellyard et al., 2007; Schreck et al., 2009), contrairement à d'autres tumeurs (Fridman et al., 2012).

Un rapport faible Th1/Th2 est associé à une évolution défavorable dans différents types de cancer (Shurin et al., 1999). Aujourd'hui, les fonctions des cytokines IL-4 (Li et al., 2009) et IL-10,(Oft, 2014) remettent en question le rôle pro-tumoral des lymphocytes Th2 qui semble être dépendant du type de tumeur et du microenvironnement (Protti and De Monte, 2012).

d) Les lymphocytes T de type Th17

Le rôle des CD4⁺ polarisés en Th17 dans l'immunité antitumorale reste encore mal compris (Muranski and Restifo, 2009; Song and Yang, 2017; Wilke et al., 2011a). Ils sont présents dans l'infiltrat tumoral, jusqu'à représenter 25% des cellules immunitaires de tumeurs ovariennes et 8% dans les tumeurs de la prostate (Miyahara et al., 2008; Sfanos et al., 2008). Et leurs rôles semblent être largement impactés eux aussi par le microenvironnement tumoral.

Ces cellules seraient associées à un mauvais pronostic dans les carcinomes hépatocellulaires (Zhang et al., 2009) et trouvés en plus forte proportion dans le sang des patients atteints de cancer d'estomac (Zhang et al., 2008). Les Th17 circulant sont aussi associés à la progression tumorale pour les cancers de la prostate hormonaux-dépendants (Derhovanessian et al., 2009). Dans des modèles murins, il a été démontré que l'IL-17 conduisait à la vascularisation et à la croissance tumorale (Numasaki et al., 2003), par l'intermédiaire de chimiokines pro-angiogéniques sécrétées par les cellules tumorales (Numasaki et al., 2005).

Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'impact des Th17 sur le pronostic. En effet, pour des patientes atteintes de cancer de l'ovaire à un stade avancé, une survie prolongée est associée à un fort taux de Th17 infiltrants et d'IL-17 dans l'ascite. Les Th17 infiltrants permettraient, dans les cancers ovariens, de recruter des cellules effectrices et pourraient contribuer à la création d'un environnement favorable aux réponses immunitaires antitumorales, par le sécrétion de chimiokines de type Th1, comme l'IFN- γ et le IL-17 (Guéry and Hugues, 2015; Kryczek et al., 2009b). De plus, l'IL-17 serait associée à la réduction de la croissance tumorale et des métastases, dans un modèle murin (Kryczek et al., 2009c).

Enfin, le transfert de Th17 spécifiques d'un antigène de tumeur, dans des cas de mélanomes murins, permettait d'induire une régression tumorale (Muranski et al., 2008). L'implication de Th17 dans le contrôle du développement tumoral est controversée, puisque des effets favorables aux réponses immunitaires antitumorales sont observés dans plusieurs types de cancers (Chen et al., 2012; Sfanos et al., 2008) et leur présence a été corrélée à la présence de cellules effectrices antitumorales (Kryczek et al., 2009b; Wilke et al., 2011b; Zou and Restifo, 2010). Leur implication dans l'évolution est certainement modifiée selon le contexte tumoral dans lequel les cellules se développent.

2) Les effets immunosuppressifs des lymphocytes Treg dans l'immunité antitumorale

Pendant le développement tumoral, les cellules immunosuppressives vont s'accumuler au site de la tumeur, comme les Treg (Bonertz et al., 2009; Schreiber et al., 2012) et vont participer à la création d'un microenvironnement immunosuppressif. De nombreux cancers présentent un tissu tumoral riche en Treg, comme les cancers du sein, des poumons, du foie, du rein ou les mélanomes, associé à une faible survie des patients (Curiel et al., 2004; Liotta et al., 2011; Merlo et al., 2009; Nishikawa and Sakaguchi, 2010). Des expériences ont été réalisées dans des modèles murins, déficients en Treg (CD4⁺ CD25⁺) par l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-CD25, montrant une augmentation des réponses immunitaires en absence de Treg (Sakaguchi et al., 2001; Sutmuller et al., 2001). Cependant, le CD25 peut aussi être exprimé par les T activés, autres que les Treg, pouvant expliquer des résultats contradictoires chez l'homme (Rech and Vonderheide, 2009; Vries et al., 2011).

Les cellules tumorales et les macrophages de type M2 infiltrants la tumeur, vont secréter CCL22, qui va attirer les cellules Treg activées qui expriment le récepteur CCR4 (Curiel et al., 2004; Mizukami et al., 2008). D'autres associations chimokines-récepteurs sont impliquées dans le recrutement des Treg, notamment après une hypoxie tumorale, comme CCL28/CCR10 (Facciabene et al., 2011) ou CXCL9-10-11/CXCR3 (Redjimi et al., 2012).

Ainsi, les Treg vont inhiber la lyse des cellules tumorales induite par les CTL (Chen et al., 2005) et les NK (Ghiringhelli et al., 2006). Ces cellules immunosuppressives produisent du

VEGF qui participe à la néoangiogenèse et donc à la croissance tumorale (Facciabene et al., 2011). Des Treg infiltrants des mélanomes ont été identifiés pour inhiber la prolifération de CD4⁺ (Wang et al., 2004).

Cependant, transformation cellulaire déroulant pour une se dans un microenvironnement inflammatoire, certains travaux ont pu identifier un rôle favorable des Treg, qui seraient dans ce cas bénéfiques à l'organisme en diminuant l'inflammation (Gounaris et al., 2009). Plusieurs études ont pu corréler le taux de Treg et la survie des patients ou la réponse aux chimiothérapies. L'équipe de Yu a pu démontrer que le taux de Treg circulant pour les patients stables ou en rémission partielle d'un cancer pancréatique non opérable, diminuait après traitement par chimiothérapie, alors qu'il augmentait pour les patients en progression (Liu et al., 2017). D'autres études ont pu corréler le taux de Treg avec la survie globale des patients dans les cancers colorectaux ou les lymphomes, et ce taux pourrait même avoir une valeur pronostique (Salama et al., 2009; Waniczek et al., 2017).

L'immunité antitumorale est donc fortement influencée par les lymphocytes T CD4⁺, autant dans l'initiation que dans le contrôle et le maintien de ces réponses immunitaires innées et adaptatives efficaces. Leurs effets peuvent être directs, en passant par des liaisons ligands/récepteurs ou indirects, en passant par l'activation d'autres cellules immunitaires ou en modulant la néoangiogenèse tumorale. L'instabilité génique caractéristique des cellules cancéreuses leur permet cependant de développer des moyens de survivre, de ne pas être reconnues et ainsi d'échapper au contrôle des cellules immunitaires.

III) La modulation de la réponse lymphocytaire T spécifique de tumeurs

Les cellules cancéreuses peuvent résister aux effecteurs de l'immunité lors de l'immunoédition de la tumeur (Dunn et al., 2002, 2004; Vesely and Schreiber, 2013; Villunger and Strasser, 1999). Cette étape d'échappement est une étape clé dans le développement et l'évolution de la tumeur rendue possible par la mise en place de différents mécanismes, que les thérapies tentent de contrer.

Plusieurs mécanismes sont en jeu lors de cette phase d'échappement. Les cellules cancéreuses vont avoir par exemple une diminution ou une absence d'expression de leur CMH-I, suite entre autre à la perte d'expression de la β2-Microglobuline (Bicknell et al., 1994), les rendant alors non identifiables par les lymphocytes T CD8⁺. Les cellules cancéreuses vont aussi pouvoir augmenter leur résistance à l'apoptose, en surexprimant leurs protéines antiapoptotiques notamment la survivine qui est un inhibiteur de caspases et en réprimant l'expression des protéines pro-apoptotiques, comme la Bax, TRAIL ou la pro-caspase-8. En addition avec ces deux mécanismes, les cellules cancéreuses vont pouvoir inhiber mais aussi détruire les cellules immunitaires impliquées dans leur élimination.

Ces dernières années, de plus en plus d'études analysent les impacts que peuvent avoir ces traitements sur les réponses immunitaires antitumorales elles-mêmes.

1) L'inhibition et la destruction de l'immunité antitumorale

L'immunité antitumorale débute avec la capture, la préparation puis la présentation des antigènes associés aux tumeurs par les DC, qui après leur activation, vont migrer dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, dans lesquelles, deux possibilités s'offrent à elles. En effet, soit un stimulus de maturation accompagne la capture et la présentation des antigènes, induisant donc des DC fonctionnelles capables d'induire une réponse T antitumorale, soit à l'inverse, aucun stimulus de maturation n'est présent, entrainant alors la génération de lymphocytes iTreg impliqués dans l'induction d'une réponse tolérogène. La mise en place d'une réponse T dépend donc du stimulus de maturation, mais aussi de l'interaction entre les molécules de costimulation et leurs récepteurs.

Des phénomènes physiologiques, indispensables à l'homéostasie du système immunitaire, permettent l'arrêt de la réaction immunitaire en passant notamment par l'inhibition des effecteurs T. Ces mécanismes de contrôles immunitaires, ou « immune checkpoints », peuvent être détournés par les cellules tumorales, afin d'échapper activement à leur détection et à leur destruction (Messerschmidt et al., 2016; Pepper et al., 2009). Plusieurs molécules des points de contrôles immunitaires ont été identifiées (Pardoll, 2012), dont deux particulièrement étudiées, à savoir cytotoxic T-lymphocyte protein 4 (CTLA-4) et programmed cell death protein 1 (PD-1). CTLA-4 est un régulateur négatif des lymphocytes T qui est exprimé par les lymphocytes T eux-même. Il entre en compétition avec CD28 pour la liaison aux CD80/86 exprimés par les CPA. PD-L1 et PD-L2 sont exprimés par les CPA et les cellules cancéreuses et vont fixer leur récepteur commun PD-1 situé en surface des lymphocytes T après leur activation ou leur expansion (Juneja et al., 2017; Simon and Labarriere, 2017). L'expression de PD-L1 est activée par des cytokines libérées dans l'environnement tumoral comme l'IFN-y, alors que PD-L2 est principalement exprimé par les DC et les macrophages. La liaison de PD-1 à ses ligands entraine l'activation d'une voie inactivatrice pour les lymphocytes T, générant ainsi des T dit épuisés ou exhausted. L'inhibition passant par CTLA-4 se produit plutôt lors de la phase de priming, alors que celle passant par PD-1 se déroule lors de la phase effectrice.

Les TIL sont souvent considérés comme la marque d'une activation des réponses immunitaires antitumorales (Zhang et al., 2003), mais il a été démontré que cette activation pouvait entrainer l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et aussi par les cellules saines. En effet, le microenvironnement tumoral serait inflammatoire et présenterait des cytokines inflammatoires sécrétées par les T, comme l'IFN- γ (Webster et al., 2006; Zhang et al., 2003). Donc la présence de ces TIL pourrait être un mauvais indicateur de réponses immunitaires efficaces.(Webster et al., 2006) Les cellules saines pourraient alors elles aussi être impliquées dans l'inhibition des réponses immunitaires antitumorales, en passant par la voie PD-1/PD-L1 (Youngnak-Piboonratanakit et al., 2004).

La régulation des réponses immunitaires se fait donc par l'intermédiaire des *immune checkpoints*, mais aussi par des cellules. En effet, une partie de l'immunosuppression est induite par des cellules immunosuppressives, comme les Treg, mais aussi des cellules de l'immunité innée, les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) (Kumar et al., 2016). Les MDSC vont être attirées au site de la tumeur par des chimiokines, comme CXCL1 via leur récepteur CXCR2. Les fonctions des MDSC sont variables, suivant leur environnement et leur localisation (ganglions lymphatiques, rate, ou tumeur). Elles peuvent créer un environnement immunosuppressif par la sécrétion de cytokines comme IL-6, IL-10 et le TGF- β , essentielles à la génération de Treg, Tr1 et Th17, mais aussi inhiber les réponses et la prolifération des lymphocytes T. Les MDSC peuvent aussi induire une augmentation d'expression de PD-L1 par la tumeur (Kumar et al., 2016). Un autre type cellulaire est aussi impliqué, les Treg. En effet, le nombre de Treg peut être augmenté, de même que leurs fonctions immunosuppressives, par la liaison des *immune checkpoints* avec leur ligand, comme PD-1/PD-L1, en passant par la voie de signalisation AKT/mTOR et PTEN.

Les cellules cancéreuses peuvent être actives envers les cellules immunitaires dont elles sont elles-mêmes la cible, par l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose, soit en utilisant des médiateurs chimiques, soit par contact direct (Costello et al., 1999). Les cellules cancéreuses seraient capables d'éliminer les CD8⁺ effecteurs ou les NK, en exprimant en surface FasL (Frost et al., 1997), qui va interagir avec son récepteur de mort, Fas, exprimé en surface des lymphocytes ou des NK. Les TIL seraient donc plus fortement impactés par ce mécanisme de défense contact dépendant, observé dans les carcinomes hépatiques ou les mélanomes. Les lymphocytes T circulants ne seraient toutefois pas totalement épargnés par ce phénomène de défense. En effet, de forts taux sériques de FasL soluble ont été détectés dans certains lymphomes (Costello et al., 1999). FasL soluble peut alors potentiellement induire la mort des lymphocytes T non-infiltrants, après sa fixation à Fas, mais ce phénomène périphérique semble se produire en proportion moins importante.

Les mécanismes d'échappement des tumeurs restent très efficaces allant jusqu'à la mise en place d'un microenvironnement suppresseur des réponses immunitaires antitumorales. Lors du diagnostic, les cellules tumorales ont alors déjà mis en place leur mécanisme d'échappement. Ainsi, malgré l'efficacité du système immunitaire, les thérapies conventionnelles permettent l'élimination des cellules cancéreuses par divers mécanismes. Or, certains de ces agents chimiques peuvent avoir des effets sur les réponses immunitaires antitumorales. Ces de évènements sont rendus possibles par l'intermédiaire thérapies dites « immunomodulatrices » et différents types cellulaires constituant le microenvironnement tumoral vont être différemment impactés.

2) L'activation de l'immunité antitumorale induite par les traitements antitumoraux

Un lien étroit existe entre le système immunitaire et la tumeur, qui peut être influencé par les traitements utilisés (Bracci et al., 2014; Zitvogel et al., 2013). Schwartz et Grindey ont, dès 1973, pu observer une diminution de l'efficacité des anthracyclines dans un modèle murin d'immunodéficience (Schwartz and Grindey, 1973). De nombreuses chimiothérapies conventionnelles, tout comme la radiothérapie, ont démontré des effets modulant les réponses immunitaires. De façon concomitante à leur effet cytotoxique, certains traitements peuvent agir en passant soit par une action directe sur les cellules cancéreuses, soit en agissant sur les cellules immunitaires en stimulant les effecteurs de l'immunité antitumorale, ou enfin en inhibant les cellules immunosuppressives (Demaria and Formenti, 2012; Rubner et al., 2012; Zitvogel et al., 2013; Galluzzi et al., 2014). Ces effets sont dépendants du contexte tumoral et immunitaire de chaque patient, des différentes stratégies de traitement, ainsi que des doses de traitement utilisées.

a) Les effets directs des agents cytotoxiques

Les chimiothérapies utilisées pour traiter le cancer ont différents modes d'action. Parmi elles, les poisons de fuseau mitotique, comme le Docétaxel, inhibent la dépolymérisation de la tubuline, ce qui désorganise le réseau cellulaire de microtubules. D'autres vont ajouter des groupements alkyls sur certaines bases de l'ADN, comme les agents alkylants. Enfin, d'autres agents sont des anti-métabolites, comme le 5-Fluorouracile (5-FU) qui est un antagoniste pyrimidique. Ces effets induisent généralement la mort des cellules par apoptose. Il existe aussi des thérapies moléculaires ciblées qui peuvent être divisées en deux groupes, les inhibiteurs de tyrosine kinases ou les anticorps monoclonaux.

b) Les effets sur les cellules cancéreuses

Les chimiothérapies peuvent aussi agir favorablement, mais parfois de façon plus indirecte, sur les réponses immunitaires.



Figure 19 : Des exemples d'immunomodulations de chimiothérapies antitumorales (d'après Bracci et al., 2014)

L'augmentation de l'antigénicité

Certaines drogues vont augmenter l'antigénicité de la tumeur en agissant sur l'expression et la présentation de leurs antigènes. Plusieurs équipes ont pu démontrer que des antigènes de tumeur avaient une expression accrue après l'action de certains traitements, tels que ACE (antigène carcinoembryogenique) après traitement par 5-Fluorouracile (5-FU) ou du Docétaxel (Prete et al., 2008; Aquino et al., 2000; Eckert et al., 1997), l'antigène LYD/E48 par l'Oxaliplatine (Rubinfeld et al., 2006), la E-cadhérine par le Docétaxel (Eckert et al., 1997), ou MAGE par le vemurafenib (Chen and Emens, 2013; Frederick et al., 2013). Les traitements comme l'Oxaliplatine, le Cisplatine, le Paclitaxel mais aussi les rayons- γ , augmentent

l'expression du CMH-I (Chen and Emens, 2013; Liu et al., 2010; Reits et al., 2006), en passant pour certains par la sécrétion d'IFN- β par les cellules tumorales elles-mêmes (Wan et al., 2012).

En effet, l'expression des gènes des cellules tumorales peut être modulée par certains traitements et va influencer la quantité des molécules du CMH et des antigènes de tumeurs exprimés. La stabilité des ARN messagers, mais aussi des modifications épigénétiques ou génétiques peuvent influencer le taux de protéines exprimées par les cellules. En effet, certains traitements comme les agents déméthylants (5-Azacytidine) ou des inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC) (trichostatine A ou l'acide valproïque), modulent les marques épigénétiques de certains gènes pouvant alors modifier l'expression de certains antigènes de tumeurs (Ellis et al., 2009; Héninger et al., 2015; Wargo et al., 2009; Weber et al., 1994). Ce phénomène peut aussi être associé à une modification du répertoire d'antigènes présentés par les CMH appelé « immunopeptidome » (Caron et al., 2011).

La stabilité de la liaison du peptide dans la poche du CMH peut aussi être augmentée, ainsi que la reconnaissance du peptide par le TCR. Ces deux types de changements correspondent à la modification de la qualité de la séquence en acides aminés traduite, résultant par exemple de mutations ponctuelles non silencieuses. En effet, certaines chimiothérapies présentent un pouvoir mutagène, comme les agents alkylants (Cisplatine, Oxaliplatine), les intercalants de l'ADN (Anthracyclines, Doxorubicine), des antimétabolites (5-FU) ou des inhibiteurs de topoisomérase (Irinotécan).

Ainsi, la quantité et la qualité des épitopes présentés en surface, issus d'antigènes de tumeurs peuvent être modifiées par les traitements antitumoraux. Le Cisplatine, la Gemcitabine, mais aussi une immunothérapie ciblant PD-1, permettent d'augmenter le répertoire antigénique de la tumeur, phénomène appelé « *antigen spreading* », notamment reconnu par les CD8⁺ effecteurs (Jackaman et al., 2012; Memarnejadian et al., 2017). Ces modifications de l'antigénome impliquent une immunosélection des cellules tumorales variable dans le temps, selon l'expression des antigènes immunogènes.

Les inducteurs d'apoptose immunogène

Certaines chimiothérapies sont connues pour avoir des effets immunostimulants, en induisant une émission de signaux de dangers par les cellules tumorales (cell death-associated molecules (CDAMs)) ou les DAMPs, ce qui augmente leur immunogénicité (Galluzzi et al., 2012; Zitvogel et al., 2010). Initialement, l'apoptose est connue pour être un évènement immunologiquement silencieux, voire même tolérogène, mais quelques agents thérapeutiques peuvent induire une apoptose capable de recruter et d'activer les cellules immunitaires.

En effet, les cellules tumorales, sous l'action de ces agents thérapeutiques comme l'oxaliplatine (Tesniere et al., 2010), meurent par un processus appelé apoptose ou mort cellulaire immunogène (ICD pour *immune cell death*) (Kroemer et al., 2013; Zitvogel et al., 2013). L'ICD se caractérise par trois évènement définis temporellement, avec dès les premières heures une exposition membranaire de la protéine calréticuline suite au stress du RE. La calréticuline est une protéine chaperonne du RE qui intervient dans la présentation des peptides par le CMH-I. La calréticuline, une fois enchâssée dans la membrane, est alors considérée comme un signal « mange-moi » (« *eat me* »). Cette protéine va pouvoir fixer son récepteur CD91 présent sur les DC (Obeid et al., 2007; Tesniere et al., 2010) et permet ainsi de potentialiser la phagocytose des corps apoptotiques provenant des cellules tumorales.

Puis, s'en suit une libération extracellulaire d'ATP par les cellules tumorales mourantes. L'ATP libre est un signal chimioattractif « trouve moi » («*find me* ») pour les DC et les macrophages en se fixant sur un récepteur P2RY2. La fixation de l'ATP sur ce récepteur permet d'une part le recrutement de ces cellules immunitaires dans le lit tumoral (Aymeric et al., 2010), favorisant la capture des cellules exposant la calréticuline (Ma et al., 2013; Martins et al., 2010) et d'autre part, l'augmentation de leur expression de CD80/86 (Idzko et al., 2007). De plus, l'ATP libre va pouvoir fixer un second récepteur, P2RX7, exprimé aussi sur les DC et permet la stimulation de l'inflammasome NLRP3. Cette stimulation conduit à la synthèse d'IL-1 β par les macrophages et DC ce qui oriente les réponses immunitaires vers les T cytotoxiques. Il a été démontré que l'utilisation d'un anticorps neutralisant l'IL-1 β ou bloquant son récepteur, permettait de contrer les effets bénéfiques des traitements utilisés contre le cancer (Ghiringhelli et al., 2009; Mattarollo et al., 2011).

Lorsque ces cellules perdent leur intégrité membranaire, une protéine nucléaire nommée *high mobility group box 1* (HMGB1) est libérée hors de la cellule. Les protéines HMGB1 seront captées sur le TLR4 présent en surface des DC. Cette interaction active la voie passant par MYD88 et entraine la maturation des DC et permet une présentation optimale des peptides (Apetoh et al., 2007).

Plusieurs chimiothérapies utilisées en cliniques, comme les anthracyclines, les Taxanes, la Doxorubicine, la Mitoxantrone, le Cyclophosphamide ou encore l'Oxaliplatine (Fucikova et al., 2011; Panaretakis et al., 2009; Tesniere et al., 2010), sont connues pour induire une apoptose immunogène (Apetoh et al., 2008). D'autres traitements peuvent induire cette mort immunogène comme la radiothérapie, mais aussi le Bortezomib, qui est un inhibiteur du protéasome utilisé dans des cas de myélomes (Demaria et al., 2005; Spisek et al., 2007).

Cette ICD contribue aussi à créer un microenvironnement tumoral plutôt caractérisé comme pro-inflammatoire. La stimulation de récepteurs à l'ATP et à HMGB1, favorise le recrutement des DCs qui vont alors phagocyter les cellules mourantes, secréter l'interleukine IL-1 β et présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T (Ma et al., 2013). Tous ces évènements favorisent une activation des réponses immunitaires, en passant notamment par le recrutement et l'activation optimale des CD8⁺ au sein de la tumeur (Apetoh et al., 2007; Kroemer et al., 2013; Tesniere et al., 2007). Il a été démontré lors d'une étude rétrospective que l'efficacité de l'Oxaliplatine faisait intervenir l'ICD chez des patients atteints de cancer colorectal (Tesniere et al., 2010).

La sensibilisation des cellules cancéreuses à l'apoptose

Certains traitements conventionnels vont agir au niveau de la sensibilité à l'attaque par les cellules immunitaires, en augmentant la capacité à induire la mort des cellules cancéreuses, mais aussi en modifiant l'état d'activation des cellules immunitaires. L'expression des récepteurs de mort tels que FAS, TRAIL-R peut être augmentée après l'action d'agents endommageant l'ADN des cellules tumorales. La liaison de ces récepteurs à leurs ligands exprimés par les cellules immunitaires entraine l'apoptose des cellules cancéreuses pouvant être immunogène, notamment pour TRAIL-TRAIL-R (Panaretakis et al., 2009). Certains agents peuvent augmenter la perméabilité des cellules tumorales, comme le Cisplatine, le Paclitaxel ou la Doxorubicine, en entrainant une augmentation d'expression du récepteur au mannose-6phosphate (M6PR), par l'induction de l'autophagie (Ramakrishnan et al., 2012). Cette forte perméabilité permet le passage du Granzyme B dans le cytoplasme des cellules tumorales, facilitant alors la lyse par les CTL (Ramakrishnan et al., 2010).

Les cellules cancéreuses, suite à l'action de certains agents antitumoraux vont subir une augmentation du taux d'expression des récepteurs de mort, ou de leur perméabilité membranaire, les sensibilisant à l'apoptose induite par les cellules immunitaires, qui de plus, peut être immunogène.

c) Les effets sur les cellules du système immunitaire

Les chimiothérapies peuvent aussi avoir des effets immunostimulants favorisant la réponse antitumorale (Kroemer et al., 2013; Zitvogel et al., 2008, 2013). En effet, l'efficacité de certaines immunothérapies est plus importante lorsqu'elles sont associées à un traitement préalable par chimiothérapie, comme l'Ipilimumab associé au Témozolomide dans des mélanomes métastatiques, ou le Paclitaxel associé au Carboplatine dans les cancers du poumon

non à petites cellules (Lynch et al., 2012; Maio et al., 2013) sans toutefois que les traitements n'induisent d'immunodéplétion (Vanneman and Dranoff, 2012).

L'activation des cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative

Un des effets des agents anti-cancéreux sur l'activation des cellules immunitaires passerait par un effet plutôt indirect, faisant intervenir le microbiote du patient. Effectivement, l'immunité du microbiote a été identifiée pour contribuer en partie au contrôle ou à l'échappement immunitaire de la tumeur. Les travaux de l'équipe de L. Zitvogel ont démontré une triangulation entre le microbiome, le système immunitaire et le cancer (Zitvogel et al., 2016).



Figure 20 : Les impacts du microbiote, notamment intestinal, sur l'immunosurveillance antitumorale induite après traitement (d'après Zitvogel et al., 2016)

En effet, les DAMPs et les antigènes tumoraux, présents dans la tumeur peuvent activer les effecteurs immunitaires antitumoraux, alors que les cytokines et chimiokines présentes dans le microenvironnement tumoral peuvent potentiellement induire ou attirer des populations immunitaires immunosuppressives. L'équilibre entre ces deux phénomènes impactera le développement des cellules tumorales. Le système immunitaire du patient, tant au niveau des effecteurs que des suppresseurs, peut être modulé par les PAMPs, mais aussi par les antigènes et métabolites dérivés du microbiome. Plusieurs agents antitumoraux sont connus pour avoir des effets secondaires au niveau intestinal, induisant une augmentation de la perméabilité intestinale et conduisant alors à une translocation de bactéries, d'antigènes bactériens ou de PAMP bactériens. Effectivement, un lien a pu être démontré entre le blocage de CTLA-4 par l'Ipilimumab, les dommages intestinaux, le déséquilibre de la flore intestinale et les réponses immunitaires anti-microbiennes et antitumorales permettant le rejet des tumeurs. L'Ipilimumab induit une augmentation de la stimulation des cellules T entre autres spécifiques des tumeurs, mais est aussi associé à une inflammation intestinale pouvant être induite par le blocage des fonctions immunosuppressives des Treg.

Ces produits bactériens peuvent migrer dans les ganglions lymphatiques mésentériques, au travers de la circulation, mais aussi dans des sites plus éloignés comme au niveau de la tumeur ou des ganglions drainant (Zitvogel et al., 2016). Les lymphocytes T et les CPA peuvent alors migrer eux aussi de l'intestin jusqu'aux ganglions lymphatiques mésentériques, aussi bien au niveau des muqueuses qu'aux sites inflammatoires, incluant la tumeur et leurs ganglions drainants. La migration de cellules immunitaires spécifiques du microbiote et la translocation bactérienne peuvent influencer les réponses immunitaires antitumorales. Dans le cas de l'Ipilimumab, il a été démontré que le passage d'un type de bactéries dans les ganglions mésentériques, favorisait une réponse médiée par les lymphocytes T Th1 connus pour être antitumoraux. Ainsi, l'activation des réponses immunitaires peut passer soit par le signal 1 médié par le TCR, avec un priming d'antigènes bactériens qui réagissent de façon croisée avec des antigènes tumoraux, ou par l'intermédiaire du signal 2 médié par les PAMPs, qui module le tonus immunitaire.

De façon intéressante, certains agents vont moduler directement l'état d'activation des réponses immunitaires, qui peut se traduire par une augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation ou au contraire une diminution de l'expression de molécules inactivatrices, comme PD-L2 par les dérivés de platines (Lesterhuis et al., 2011; Luo and Fu, 2016). Un traitement par Lenalidomide permet d'augmenter l'expression de CD80/86 (Aue et al., 2009) et d'autres chimiothérapies comme la Doxorubicine permettraient de diminuer l'expression membranaire de PD-L1, qui serait orienté au noyau pour induire un effet cependant antiapoptotique (Ghebeh et al., 2010). Le Panobinostat, un inhibiteur d'histone désacétylase, permettrait une diminution de l'expression de PD-L1 dans un modèle murin (Peng et al., 2014). Le Paclitaxel permettrait de bloquer l'axe PD-1/PD-L1 dans un modèle murin (Peng et al., 2015). Le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 /PD-L2 suggère l'inhibition des fonctions cellulaires des Treg favorisant l'efficacité des réponses immunitaires antitumorales (Böhm et al., 2016).

D'autres traitements peuvent avoir un impacte sur les DC, ce qui favoriserait entre autres la présentation antigénique. En effet, un traitement utilisé dans le cancer du pancréas, la Gemcitabine, est connu pour augmenter le nombre de monocytes et de DC myéloïdes circulants (Soeda et al., 2009). De plus, de faibles doses en MitomycineC, Methotrexate ou Doxorubicine entrainent une augmentation du taux de molécules de costimulation, CD80, CD86 et CD40, et de CMH-II (Shurin et al., 2009).

Concernant les cellules de l'immunité adaptative, certaines chimiothérapies ont des effets activateurs sur les lymphocytes T. C'est le cas du cyclophosphamide qui favorise la différenciation des T en Th17, pour les cellules circulantes, comme pour les TIL (Viaud et al., 2011). Cependant, cette sous-population possède un rôle ambigu dans la lutte contre le cancer. Les taxanes, eux sont connus pour être associés à une augmentation des sécrétions d'IL-2 et d'IFN- γ . Ainsi, cette classe de chimiothérapie pourrait favoriser plutôt une polarisation en cellules Th1, connues pour être antitumorales (Tsavaris et al., 2002).

L'inhibition des cellules immunitaires inhibitrices

Différents cellulaires sont impliqués dans l'établissement d'un types microenvironnement tumoral immunosuppressif, comme les MDSC, les macrophages de type 2 (M2) (Biswas et al., 2013; Noy and Pollard, 2014) et les lymphocytes Treg (Coussens et al., 2013; Vesely et al., 2011). Ces cellules immunosuppressives peuvent aussi être impactées par certains traitements antitumoraux en diminuant leur quantité ou leurs fonctions immunosuppressives. Les MDSC infiltrants la tumeur vont être diminuées en nombre dans les modèles murins de greffe tumorale, par l'action du 5-FU et du Docétaxel (Kodumudi et al., 2010; Vincent et al., 2010). La proportion de MDSC dans la rate va aussi être diminuée par l'action du 5-FU et de la Gemcitabine (Suzuki et al., 2005; Vincent et al., 2010). Le Paclitaxel, lui, favoriserait la différenciation in vitro des MDSC en DC (Michels et al., 2012).

Des inhibiteurs du récepteur au *colony stimulating factor* (CSF-1R) entrainent une diminution du recrutement des macrophages au sein de la tumeur, dans un modèle murin de tumeur de l'utérus (Strachan et al., 2013). Ce traitement modifie aussi la polarisation de M2 et cet effet est associé à une régression tumorale dans un modèle de glioblastome (Quail and Joyce, 2013).

Le Cyclophosphamide, à doses très faibles, est connu pour modifier les fonctions des Treg (Ghiringhelli et al., 2007; Le and Jaffee, 2012). D'autres agents thérapeutiques comme les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) ont démontré un effet négatif sur l'expression de la molécule IDO, qui est une enzyme indispensable pour les Treg (Sharma et al., 2009). L'Imatinib entraine une diminution de l'infiltration des Treg, par l'induction de leur apoptose suite à la diminution de l'expression de IDO par les cellules tumorales, qui est accompagnée d'une augmentation des réponses immunitaires T antitumorales (Balachandran et al., 2011; Rusakiewicz et al., 2013). Dans des modèles murins de greffe tumorale, l'Oxaliplatine va pouvoir modifier le ratio CD8/Treg en faveur des réponses antitumorales, notamment dans les métastases du foie et de la rate (Gonzalez-Aparicio et al., 2011). La différenciation des lymphocytes T du sang périphérique en Treg, après une culture in vitro en présence d'IL-2 et TGF- β , est inhibée après traitement par Cyclophosphamide et Gemcitabine (Kan et al., 2012).

Enfin, le VEGF est connu pour avoir de nombreux rôles immunosuppresseurs. L'utilisation d'un anticorps ciblant VEGF ou un TKI permettrait d'empêcher l'inhibition de la maturation et des fonctions des DC, le recrutement des Treg et les MDSC infiltrants (Goel et al., 2011; Goel and Mercurio, 2013).

Ces traitements présentent ainsi de nombreux effets sur les cellules tumorales et immunitaires, et ce de façon plus ou moins directe. La grande diversité et variabilité des cellules tumorales au sein même d'un individu, que ce soit à un instant T, ou au cours du temps, ainsi que celle des cellules immunitaires, crée toute la complexité de cette pathologie. L'évolution de l'équilibre entre ces deux grands types de cellules est très rapide et peut être influencée par la large gamme de traitements antitumoraux existants.

Hypothèses de recherche

Le système immunitaire contrôle l'évolution de la tumeur (Koebel et al., 2007), alors que les cellules tumorales vont acquérir de nouvelles modifications génétiques ou épigénétiques de façon aléatoire ou induites par un agent carcinogène. Certaines tumeurs possédant des mutations inactivatrices dans les mécanismes de réparation de l'ADN, comme les *mismatch repair* ont été associées à de plus fortes charges mutationnelles, mais aussi de meilleurs pronostics (Lee and Le, 2015). De plus, de fortes charges mutationnelles sont associées à une meilleure efficacité des inhibiteurs des immune checkpoints, comme l'anti-CTLA-4 dans le mélanome (Snyder et al., 2014; Van Allen et al., 2015) ou anti-PD-1 dans le CBNPC (Rizvi et al., 2015).

Ces études confirment l'importance du rôle des réponses immunitaires adaptatives, dans la lutte contre le cancer. Des réponses T antitumorales efficaces nécessitent la reconnaissance d'épitopes, provenant d'antigènes de tumeur, comme les antigènes mutés. Cependant, toutes les mutations ne donnent pas naissance à un néoépitope immunogène.

Ce travail a porté sur l'identification de réponses immunitaires dirigées contre des néoépitopes sélectionnés in silico par des algorithmes de prédictions. Tout d'abord, un cas de rémission complète d'un hépatocarcinome cellulaire (CHC), au stade métastatique, a pu être rapporté par le CHRU de Besançon, après traitement par Sorafenib, en première ligne. Cet inhibiteur de multiples kinases est connu pour être antiangiogénique et anti-prolifératif, mais il est aussi connu pour inhiber les cellules immunosuppressives. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude des réponses T dirigées contre les néoantigènes de ce patient. Le second sujet est l'étude de mutations induites par un agent alkylant, l'oxaliplatine, sur une lignée de cancer du côlon, HT29. Ce traitement est largement utilisé pour les patients atteints d'un cancer colorectal. Cet agent est connu pour avoir une signature mutationnelle spécifique, en ciblant plus particulièrement certaines bases de l'ADN.

Dans ces deux premières études, notre hypothèse de recherche est que les mutations présentes au sein des cellules cancéreuses peuvent induire des néoantigènes participant à l'élimination du cancer par les lymphocytes T.

Objectifs

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons mis en place une stratégie d'immunologie inverse nous permettant d'identifier des épitopes potentiellement immunogènes, pouvant potentiellement fixer, un ou plusieurs HLA. Ensuite, différentes études in vitro ont été réalisées afin de confirmer la présence de réponses immunitaires dirigées contre ces épitopes.

Partie 1

i) Identification de néoépitopes candidats potentiellement immunogènes après rémission complète d'un hépatocarcinome cellulaire après traitement par sorafenib.

ii) Évaluer les réponses Th1 spécifiques des néoantigènes dirigées contre la tumeur du patient.

Partie 2

i) Étudier la présence d'une signature mutationnelle induite par l'Oxaliplatine dans une lignée de tumeur du colon.

ii) Identifier des néoépitopes candidats potentiellement immunogènes induits après traitement.

Résultats

Première partie:

Identification de néoépitopes immunogènes associés à un hépatocarcinome cellulaire avancé en rémission complète après traitement pas Sorafenib

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer le plus répandu dans le monde et son diagnostic se fait le plus à un stade avancé, lorsque la chirurgie n'est plus possible. La forte mortalité, 600 000 cas par an correspondant aussi à l'incidence, peut être expliquée par ce diagnostic tardif. Les radios et chimiothérapies ne sont généralement pas efficaces pour les CHC. Le Sorafenib est le traitement de référence pour traiter les CHC métastatiques et permet une rémission complète dans 0,6% des cas.

Cette étude réalisée au cours de ma thèse concerne un patient diagnostiqué à un stade métastatique pour un CHC, qui a présenté une réponse complète après traitement par Sorafenib. L'hypothèse de cette étude est que le Sorafenib, par ses multiples effets, a pu moduler le microenvironnement tumoral, le rendant ainsi permissif aux réponses immunitaires. Pour cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'étude des réponses immunitaires T dirigées contre des néoantigènes, spécifiques de tumeur.

Un séquençage d'exome (WES) a été réalisé sur les cellules tumorales et saines de ce patient, ce qui a permis d'identifier les mutations somatiques non silencieuses spécifiques des cellules tumorales. Puis, par une étape d'immunologie inverse, une liste de neoépitopes candidats a été généré *in silico* par des algorithmes de prédiction pour la fixation d'épitopes sur les molécules du CMH-II.

Lors de cette étude, trois épitopes immunogènes, capables d'être présentés aux lymphocytes T CD4⁺ par le CMH-II, ont pu être identifiés, issus des protéines mutées $HELZ2^{V241M}$, IL1- β ^{S230F} and MLL2^{A4802S}. Ainsi, des réponses mémoires T spécifiques de la tumeur dirigées contre les néoantigènes ont été identifiées.

L'action du Sorafenib a certainement induit une modification de l'environnement tumoral, en inhibant les cellules immunosuppressives Treg et MDSC, rendant permissif l'environnement à ces réponses immunitaires T CD4⁺. Ces réponses immunitaires identifiées contre deux néoantigènes ont pu participer à l'élimination des tumeurs, après traitement par Sorafenib, et participent à la mémoire immunitaire antitumorale. Personalized identification of tumor-associated immunogenic neoepitopes in advanced hepatocellular carcinoma in complete remission after Sorafenib treatment

Vrecko S.^{1,2,3}, *Guenat D.*^{4,5,6}, *Mercier-Letondal P.*^{1,3}, *Faucheu H.*^{2,5}, *Dosset M.*^{1,3}, *Royer B.*^{1,2,7}, *Boidot R.*⁸, *Kim S.*⁹, *Jary M.*^{1,2,9}, *Adotévi O.*^{1,2,3,9}, *Borg C.*^{1,2,3,9}, *Godet Y.*^{1,2,3}

¹ INSERM, UMR1098, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, Besançon, France

² Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

³EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

⁴ Université de Bourgogne Franche-Comté, EA3181, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-

0021, Besançon, France

⁵ Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, CHRU de Besançon, France

⁶ Department of Medicine, Division of Oncology, Stanford Cancer Institute, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA.

⁷ Laboratoire de pharmacologie, CHRU de Besançon, France.

⁸ Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Centre Georges François Leclerc, INSERM, UMR 866, Dijon, France

⁹ Service d'oncologie médicale, CHRU de Besançon, France.

Article soumis dans Oncotarget

Abstract

Sorafenib, a multi-targeted kinase inhibitor, is the current standard systemic treatment for advanced HCC. Sorafenib has anti-angiogenic and anti-proliferative properties and is also known to favor anti-tumor T cell responses by reducing the population of immunosuppressive cells such as Treg and MDSC. Anti-tumor immune response, especially mediated by CD4⁺ T-cell, are critical for tumor cells eradication and therapies modulating those responses appealing in a growing number of cancers.

Here, we report and investigate the case of a patient diagnosed with an advanced HCC treated by sorafenib who experienced a complete histological response. We aimed to identify immunogenic peptides derived from tumor mutated proteins that stimulated CD4⁺ T cells responses thus favoring the exceptional recovery process of the studied patient.

Tumor neoantigens were identified using whole exome sequencing of normal and tumor tissue and peptide MHC binding prediction algorithms. Among 442 tumor-specific somatic variants, 50 missense mutations and 20 neoepitopes predicted to bind MHC-II were identified. Candidate neoepitopes immunogenicity was assessed by IFN- γ ELISpot after culture of patient's PBMCs in presence of synthetic neopeptides.

 $CD4^+$ memory T cell responses were detected against a mutated IL-1 β^{S230F} peptide and two additional neoepitopes from HELZ2^{V241M} and MLL2^{A4458V} suggesting that efficient antitumor immune response occurred in this patient. These results showed that T cells can recognize neoantigens in HCC and may lead to the cancer elimination after immunomodulation in the tumor-microenvironment induced by sorafenib. This observation indicates that other immunotherapies in combination with sorafenib could potentially increase the response rate in HCC at advanced stage.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC), the most common primary malignant neoplasm of the liver (85%-90%) (Hashim et al., 2016), is the sixth most frequent cancer in the world and the third cause of cancer-related death.(Ursino et al., 2012) In the majority of patients the disease is diagnosed at advanced stages and less than 20% of patients with HCC are eligible for curative treatments. To date, only 3 therapeutic approaches are considered as curative: surgical resection, liver transplantation and percutaneous radiofrequency ablation.

Conventional chemotherapies did not show any significant benefits in the treatment of HCC except for transarterial chemoembolization which allows a slight increase of life expectancy. In advanced stage, sorafenib has been approved as a standard, according to the Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging and its updates (Llovet et al., 1999). In the Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol (SHARP) phase III trial, patients with advanced HCC were treated with sorafenib or placebo. The median overall survival significantly increased in the sorafenib group compared with the placebo group (10.7 *vs* 7.9 months, HR=0.69; 95% CI:0.55 to 0.87; p<0.001) (Llovet et al., 2008). However, there were no complete response in either group and objective responses rates remained poor and were between 2 and 3.3%.

Sorafenib is an oral multikinase inhibitor that mainly targets kinases involved in tumor cell growth and angiogenesis such as Raf kinases (CRAF, BRAF, V600E BRAF) and tyrosine kinases (FLT3, KIT, VEGFR2/3 and PDGFRb) (Wilhelm et al., 2006). *In vivo*, sorafenib has limited effects on HCC tumor cell proliferation (Llovet et al., 2008). Nevertheless, sorafenib has the potential to induce a complete remission in few cases (less than 1%) of advanced HCC cases (Shiba et al., 2014). Besides, sorafenib's targets, such as c-kit, VEGFR and Flt-3, are abundantly expressed in immune cells such as regulatory T cells (Treg) and myeloid-derived suppressive cells (MDSC) (Voron et al., 2014; Keating, 2017). Sorafenib has thus been

implicated in the reduction of Treg and MDSC number and in the lowering levels of immunosuppressive cytokines (Kalathil et al., 2016 ; Cabrera et al., 2013 ; Desar et al., 2011 ; Rosmorduc and Desbois-Mouthon, 2011). Moreover, sorafenib has been shown to reduce the immunosuppressive burden by reducing PD-1 expression on circulating T cells (Kalathil et al., 2016 ; Cabrera et al., 2013)

During the last decade, evidences of the impact of active antitumor immune response on clinical outcome of HCC patients have been described (Cao et al., 2007; Yarchoan et al., 2017) CD3⁺ and CD8⁺ cell densities has been significantly associated with a low rate of recurrence and a prolonged relapse-free survival (Gao et al., 2007 ; Gabrielson et al., 2016). Furthermore, high levels of intratumoral and peripheral blood Treg were associated with a higher alpha-fetoprotein (aFP) level, a more advanced TNM stage, and a more vascularized tumor (Sun et al., 2017 ; Gao et al., 2007 ; Pardee and Butterfield, 2012) The progressive deficit of CD4⁺ T cells functionality induced by FoxP3⁺ regulatory T cells was also correlated with poor survival and high recurrence rates in HCC patients (Fu et al., 2013 ; Cao et al., 2007a ; Unitt et al., 2005)

Antitumor immune response could be driven by the recognition of neoantigens somatically generated by mutations in tumor cells. Interestingly, most of the specific-neoantigen immune responses observed are CD4+ T cells (Kreiter et al., 2015) and several studies highlighted a critical role for neoantigen-specific CD4⁺ T cell responses in tumor elimination (Kreiter et al., 2015; Ott et al., 2017; Tran et al., 2014). Indeed, Tran *et al.* demonstrated that adoptive transfer of CD4⁺ T cells specific of ERBB2IP mutation lead to an objective tumor response in metastatic cholangiocarcinoma.

The link between the effects of sorafenib on the immune system and its efficacy in advanced HCC remains a matter of investigations. We hypothesized that CD4⁺ T cell antitumor immune response targeting HCC preexists in some patients and that efficacy of

immunomodulatory drugs such as sorafenib may be related to their immune status (Rai et al., 2017; Longo et al., 2017). To support this hypothesis, we aimed to identify in the present study the immunogenic mutations efficiently recognized by CD4⁺ T cells in an advanced HCC patient in complete histologic response after sorafenib treatment.

Results

Complete Histologic Response Induced by Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma

In September 2011, a 51-year-old male patient presented with a large hypervascular liver tumor that measured 20 cm with satellite nodules disseminated in all the liver segments. (Fig. 1). A biopsy was performed at the University Hospital of Besançon and the pathologic examination revealed a hepatocellular carcinoma. The patient had no history of cirrhosis and extrahepatic extension assessment was negative. The patient's serum AFP level was 55 ng/mL. In October 2011, sorafenib therapy was initiated at a dosage of 200 mg twice per day and rapidly followed by 400 mg twice per day for 8 months. No side effects were observed expect a moderate grade 1 hand foot syndrome and grade 1 diarrhea that made necessary a temporary reduction of the posology to 200mg twice per day.

After 3 months of treatment a partial response was observed, with a substantial reduction of the tumor burden from 20 to 7.5 cm. After 11 months, a complete surgical resection of the tumor area was achieved and pathologic examination revealed a complete histologic response. Five years later, the patient was still free of disease.

Mutational profiling

To identify candidate immunogenic neoantigens we applied an inverse immunological strategy. A whole exome sequencing (WES) was carried out on the tumor biopsy at diagnosis as well as on autologous normal hepatocytes from the resected liver tissue. The WES identified 57,430 unfiltered variants in cancer cells (Fig. 2). Variants were found in genes known to be

mutated in HCC such as SF3B1, APOB and APOBR (The Cancer Genome Atlas Research and Network, 2017). However these genes presented only common SNP mutations thus questioning their implication in oncogenesis. Comparison of the 57,430 variants with normal cells resulted in the identification of 2,585 variants only found in tumor cells and 758 of them had coding mutations. Among them, 442 were somatic tumor specific mutations, and 50 of these being missense mutations (Supplementary Table S1). These 50 mutations were used to establish a list of candidate neoepitopes which could bind patient's MHC-II alleles.

The number of somatic mutations in this patient is in line with the somatic mutation load commonly observed in HCC (Alexandrov et al., 2013), which are not belonging to the hypermutated cancers group (Schulze et al., 2015). Among proteins encoded by the 50 missense tumor specific mutated genes, some are reported to be frequently mutated in other cancers in the COSMIC database (accessed in June 2017). For example, MUC16 was found mutated in 7.4 % of cancers (2225 mutated out of 30047 tested samples), MLL2 in 4.8 % (1633 out of 34019), FAT1 in 3.81 % (1169 out of 30688) and BAI3 in 2.75 % (823 out of 30208) (Supplementary Table S1). In addition, with the exception of SYK, no clear oncogenic kinase targeted by sorafenib was identified as mutated. Among 50 SNV mutations studied, only three have already been reported in COSMIC database: ANKRD42^{R119Q}, CLMN^{K488E}, FASN^{R425W}, respectively in an endometria carcinoma, skin carcinoma and stomach carcinoma (COSMIC database, 2017-June).

Mutational signature of single-nucleotide variants (SNV) was also studied by analyzing the distribution of each mutation in 96-trinucleotide combinations as described by Alexandrov *et al.*(Alexandrov et al., 2013) Each combination is defined by the substitution class (C>A ; C>G ; C>T ; T>A ; T>C ; T>G) and the sequence context immediately 5' and 3' to the mutated base (Fig. 2b). A mutational signature which does not seem to correspond to any described mutation signature in the COSMIC database (<u>http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures</u>) was
identified.(Alexandrov et al., 2013) This observation suggests a mutational signature with a predominance of (C>A), (C>T) and (T>G) substitutions at trinucleotide motifs in cancer cells, without exceeding 4 % of total SNV.

In silico prediction of tumor-specific neoepitopes

MHC-II genotyping indicated that the patient is homozygote for HLA-DRB1*1501, HLA-DPB1*0401 and HLA-DQB1*06. As the magnitude of the HLA-DR-restricted responses have been described as significantly higher than HLA-DP,(Laheurte et al., 2016) we focused on HLA-DRB1*1501 to identify candidate neoepitopes. An *in silico* prediction approach was performed using both Syfpeithi and Immuneepitope algorithms with the protein sequences encoded by the 50 missense cancer-specific mutations. Twenty peptides were predicted to bind HLA-DRB1*1501 molecules with a binding score >20 (Syfpeithi) and/or a percentile rank <10 (Immuneepitope). The mean predicted IC50 (nM) of each mutant or WT peptides were reported (Table 1). Several peptides identified are predicted to also bind HLA-DPB1*0401, but not HLA-DQB1*0601 (data not shown). Some mutations are predicted to enhance the peptide affinity for HLA-DRB1*1501 and -DPB1*0401 (i.e.: GABRG2^{S306Y}, HHIPL1^{P386L} and IL-1 β^{S230F}), and others do not significantly modify their affinity (i.e.: ANKRD42^{R119Q}, HELZ2^{V241M}, MLL2^{A4458V}, MMP3^{R303S} and PCDHGB7^{R714C}) (Table 1).

Identification of immunogenic tumor-associated neoepitopes

The ability of the selected neopeptides to stimulate $CD4^+T$ cells was then tested. For this purpose, lymphocytes isolated from patient's peripheral blood were stimulated *in vitro* using a pool of neopeptides (Table 1). T cells secreted IFN- γ against pool-1, -2 and -3 while no response was observed against pool-4 (Figure 3a). To identify which specific neoepitopes within neopeptide pools stimulated T-cells, we deconvoluted all stimulatory pools (Figure 3b, c and d). Peptides named 49, 51, both from pool-2, and 53 from pool-3 were identified as immunogenic. No immunogenic peptides could be identified from pool-1. Thus, patient's PBMC recognized at least three neopeptides named 49, 51 and 53 corresponding to $HELZ2^{V241M}$ (Helicase with zinc finger domain 2), $IL-1\beta^{S230F}$ (Interleukine-1 β) and $MLL2^{A4802S}$ (Histone-lysine N-methyltransferase 2D) mutations (Supplementary Table 1). Interestingly, neopeptides 51 and 53 are predicted to have a better binding affinity for HLA-DRB1*1501 and HLA-DPB1*0401 than their WT counterpart. They are also predicted to have a better binding affinity for HLA-DRB1*1501 than for HLA-DPB1*0401. Among the neopeptides selected, based on the percentile rank, $IL-1\beta^{S230F}$ and $MLL2^{A4802S}$ mutated peptides on HLA-DRB1*1501 corresponded to the second and sixth better binders respectively. In contrast HELZ2^{V241M} mutated peptide corresponds to the thirteenth for HLA-DRB1*1501 and the third for HLA-DPB1*0401.

Detection of CD4⁺ memory T cell responses against tumor-specific neoantigens

To evaluate the mutation specificity of the T cell recognition, T cells were stimulated by the mutated peptide or its wild type counterpart (Table 1). Based on binding prediction IL- $1\beta^{S230F}$ seemed to be a neoagretope with an IC50 of 47 nM for the mutated peptide versus 322 nM for the WT peptide in the HLA-DRB1*1501 context, and 67 nM for the mutated peptide versus 396 nM for HLA-DPB1*0401 (Table 1). However, while T cells recognized the three mutated peptides: HELZ2^{V241M} (RMQAASFGTFEQWVV), IL-1 β^{S230F} (FEFAQFPNWYISTS) and MLL2^{A4802S} (SGHLLLQKLLRAKNV), only IL-1 β was recognized among the WT peptides (Figure 4a. and b.). Nonetheless, IL1- β^{S230F} was able to stimulate specific responses with much more efficiency than the corresponding WT peptide as the number of IFN- γ secreting T cells was 3.8 times higher (Figure 4b). HELZ2 ^{V241M} and MLL2 ^{A4802S} which were not predicted to increase HLA binding affinity for HLA-DRB1*1501 (Figure 4c) and HLA-DPB1*0401 (Figure 4d) may be implicated in the TCR-HLA/peptide recognition. Overall, we demonstrated the presence of tumor specific CD4⁺ memory T cell responses against 3 neopeptides, IL-1 β^{S230F} . HELZ2^{V241M} and MLL2^{A4802S}.

CD4⁺ T cell recognition of processed mutant proteins and HLA restriction

To further characterize these responses, the isolation of neopeptide-specific CD4⁺ Tcell clones was realized after a step of IFN- γ^{*} cell sorting assay. Clones were successfully obtained from HELZ2^{V241M}-peptide stimulated PBMCs but not from the two other T cell lines. As shown in Fig. 5a, CD4⁺ T cell clones were only able to recognize the HELZ2^{V241M} neopeptide and not the IL-1 β^{S230F} or MLL2^{A4802S} neopeptides. In addition, we showed that the clones stimulated by HELZ2^{V241M} neopeptide mainly produced IFN- γ and IL-2, in agreement with a Th1 polarization (Fig. 5b). Thus, these results showed that HELZ2^{V241M}-specific CD4⁺ T-cell clones can be generated from the patient's peripheral blood and were Th1 polarized. To further identify the HLA context of this recognition we co-cultured a HELZ2^{V241M}-specific CD4⁺ T cell clone with pan HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ blocking antibodies. While no difference of IFN- γ secretion was found between control and pan HLA-DQ or -DR blocking antibodies, IFN- γ secretion was completely abrogated in presence of pan HLA-DP blocking antibodies (Fig. 5c). The patient being HLA-DPB1 homozygous, the CD4⁺ T cell clone recognize the HELZ2^{V241M}/HLA-DPB1*04 context. Thus, these results implied that memory HELZ2^{V241M}/HLA-DPB1*04 specific CD4⁺ T cell were present in patient's blood.

Finally, HELZ2^{V241M}-specific CD4⁺ T-cell clones were stimulated by HLA-DPB1*04 expressing B-EBV pulsed with a range of peptide concentrations from 100 to $10^{-7} \mu$ M. The EC50 of IFN- γ secretion was observed at peptide concentration of 500 nM of HELZ2^{V241M} whereas no IFN- γ was produced in response of HELZ2 WT (Fig. 5d). Despite of the low T cell clone avidity, co-culture assays were realized with allogenic MoDC to assess the processing of the HELZ2^{V241M} peptide. MoDC were pulsed with cell lysate of SiHa cell line transfected with Tandem MiniGene (TMG) -1 or -2 and co-culture overnight with CD4⁺ T cell clones. These TMG encode a protein control (TMG-1) or a protein including a 35mer peptide encompassing HELZ2^{V241M} mutation (TMG-2). IFN- γ ELISA of these co-culture revealed that HELZ2^{V241M} peptide is efficiently processed and presented to CD4⁺ T-cell (Fig. 5e).

Discussion

In an attempt to better understand the factors involved with the effectiveness of the sorafenib treatment in HCC, we carried out a study in a patient with an advanced HCC treated with this molecule that experienced a complete histological response. Despite a moderate overall survival improvement, sorafenib a standard for advanced HCC, according to the Barcelona criteria. Several studies demonstrated the critical importance of tumor immunity and the effectiveness of immunotherapy in HCC (Flecken et al., 2014; Gabrielson et al., 2016; Mizukoshi et al., 2011; Sun et al., 2017; Yarchoan et al., 2017). Sorafenib has been shown to have immunomodulatory properties (Cabrera et al., 2013), by enhancing the activity of tumor-specific T cell and by reducing the suppressive immune cell populations such as Treg and MDSC (Desar et al., 2011; Rosmorduc and Desbois-Mouthon, 2011). Of note, a study by Cabrera *et al.* showed that sub-pharmacologic doses of sorafenib impact subsets of T cells differently, selectively increasing effector T cells from patient's HCC, while blocking Treg function (Cabrera et al., 2013).

The power of combining next-generation sequencing of cancer DNA with reverse immunology to identify T cell epitopes have been highlighted in recent publications (Parsons et al., 2011; Snyder et al., 2017). It has been shown that a unique tumor neoantigen could favor the elimination of cancer cell by T cells in mouse model (Matsushita et al., 2012) but also in human cancers.(Tran et al., 2015) Despite the apparent low frequency of tumor-reactive T cells in gastrointestinal cancer (Turcotte et al., 2013), the strategy reported here lead to successful isolation of neoantigen-reactive T cells from circulating blood.

The WES, on normal and cancer cells of the patient reported, has allowed to identify tumor-specific missense mutations. As far as we know, this is the first WES performed on a sorafenib-responsive HCC patient. MUC16 which was found to have an impact on the cancer immunogenicity and has been shown to be implicated in the inactivation of NK cells and monocytes (Felder et al., 2014) was found mutated. Moreover a recent study of Balachandran et al. identified MUC16 neoantigens in long-term survivors of pancreatic cancer (Balachandran et al., 2017). However, the MUC16 mutation expressed by the patient's tumor cells does not seem to be presented by its HLA class II molecules as low binding capacities were predicted. Nevertheless, several mutated genes encoding proteins of which mutated peptides are predicted to bind patient's HLA class II were identified. Three out of 20 predicted neopeptides were recognized by patient's PBMC suggesting the presence of tumor-specific CD4⁺ T cell memory responses, potentially implicated in HCC elimination. Although the three immunogenic mutations (HELZ2^{V241M}, IL-1 β^{S230F} and MLL2^{A4802S}) identified in our study had never been described so far, these genes are known to be mutated in HCC (Schulze et al., 2015). MLL2 is a histone methyltransferase described as driver in numerous cancer types (Parsons et al., 2011; Stephens et al., 2012; Yin et al., 2014). Its oncogenic mechanism is unclear but it was demonstrated that mutation of MLL2 in mouse cells resulted in genomic instability (Kantidakis et al., 2016). HELZ2 is a protein implicated in the peroxisome activity, implicated in the stimulation and the proliferation of tumor cells via PPAR- \Box pathway activation. IL-1 β is a proinflammatory cytokine activating the MAP kinase pathway and was reported as a potential marker influencing HCC progression from stage III to stage IV (Li et al., 2016). T cell responses specific of HELZ2^{V241M} and MLL2^{A4802S} were only found against mutated peptides and not against their wild-type counterparts. These data confirmed a study by Ott et al. (Ott et al., 2017) which found that 86 % of T cell lines were reactive against mutated peptides only.

Only HELZ2^{V241M} specific T cell clones could be isolated. This may be due to the longterm expansion required to achieve sufficient cell numbers for analysis which decreases the frequency of lower proliferative T cells (Ott et al., 2017). Previous studies showed that HLA- DR are the most immunogenic HLA class II molecules and especially compared to HLA-DPB1*04 (Wang et al., 2008). However, despite the selection of neoantigens on the basis of predicted HLA-DRB1*1501 binding affinity, HELZ2^{V241M} -specific T cell clones were restricted by HLA-DPB1*0401. This results highlight the work that still need to be done to improve HLA class II binding algorithms. It is thus important to select candidate epitopes by testing several HLA-binding prediction and algorithms. Our selection process may induced a potential loss of immunogenic neopeptides, but it has permitted to drastically reduce the number of tested neopeptides and to isolate 3 immunogenic neopeptides among 20 selected candidates. This number of immunogenic neopeptides is in line with the 2-4 immunogenic peptides per patient previously found in another study by Ott et al. (Ott et al., 2017). The absence of HELZ2 and MLL2 WT peptides immunogenicity, suggests that both somatic mutations might generate a neoepitope. Furthermore, the predicted binding affinity of both WT peptides present a similar capacity to bind HLA molecules than their mutated peptides counterpart. These results suggest an implication of the mutation in the direct interaction between the peptide and the TCR. Based on binding predictions it was unlikely to found a T cell response against IL-1 β WT peptide as it presented a low affinity for HLA-DPB1*0401 (396 nM) and HLA-DRB1*1501 (322 nM). However, it was described that 8 out of 10 neoepitopes with a low affinity (> 500nM), induced a tumor rejection in tumor mouse model after immunization (Duan et al., 2014).

In the present study, antitumor immune responses have only been evaluated after remission and not before or during patient's treatment. Another limitation of our work is the absence of data regarding the expression of the mutated proteins. Nonetheless, in the present study we identified memory T cell responses for all these 3 immunogenic peptides 5 years after remission, which support the idea that these proteins were expressed by tumor cells. The neoepitopes identified may thus be implicated in the enhancement of the tumor immunogenicity (Matsushita et al., 2012 ; Tran et al., 2015 ; Ott et al., 2017). Indeed, memory T-cell responses

mostly reveal dominant epitopes (Yewdell and Bennink, 1999). However we cannot assert that $HELZ2^{V241M}$, IL-1 β^{S230F} and $MLL2^{A4802S}$ specific CD4⁺ T cell responses were sufficient to induce the elimination of the whole tumor cells observed during the complete response. The correlation between T cell response specific for neoantigens and the postsurgery survival in HCC has never been studied and deserves further investigations (Mennonna et al., 2017 ; 'Tran et al., 2015 ; 'Matsushita et al., 2012).

The ability of T cells to target unique mutations in HCC efficiently treated by sorafenib is an additional clue to extend immunotherapies to HCC patients. This observation along with a study by Kalathil *et al.* suggesting that T cell responses preexisting in HCC were inhibited by PD-1 reinforces the idea that analyzing the PD-1 expression on circulating HCC-specific T cells would be useful to establish news immunotherapy strategies in HCC (Kalathil et al., 2016). Thus, it may also be possible to identify potential sorafenib-responsive patients by identifying the PD-1 expression in circulating T cells. Finally, these data suggest a therapeutic potential for an anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy combined to sorafenib treatment known to decrease the immunosuppressive burden in the context of advanced HCC (Kalathil et al., 2016).

In conclusion, in the light of the results of recent studies on the efficacy of immunotherapies in HCC, our data suggest a therapeutic potential for immune check-point blockade in combination with sorafenib to decrease the immunosuppressive burden and reach a higher response rate in advanced HCC (El-Khoueiry et al., 2015; Mizukoshi et al., 2011; Zhou et al., 2017).

Materials and methods

Patient

Hepatocellular carcinoma patient (HCC) was recruited through the Department of Medical Oncology of the University Hospital of Besançon (France). The patient was enrolled after the signature of informed consent, and after approval by the local ethics committee.

DNA extraction

Tumor genomic DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) using QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Prior to DNA extraction, separate hematoxylin-eosin stained slides were reviewed by a pathologist. Normal liver tissue was isolated from post-hepatectomy fixed tissue. Tumor tissue was isolated from the initial biopsy at diagnosis and was manually macrodissected. The tumor content was 70 % after macrodissection. DNA and tissue samples were collected by the biobank BB-0033-00024 "Tumorothèque Régionale de Franche-Comté"

Whole exome sequencing

Library preparation, capture, sequencing, and bioinformatics analysis were performed by IntegraGen, Evry, France. Genomic DNA was captured using SureSelect Human All Exon v4 + UTR - 70Mb (Agilent) according to manufacturer's instruction and protocols without modification except for library preparation which was performed using NEBNext Ultra kit (New England Biolabs). Pooled capture-enriched DNA samples were then sequenced by paired-end 75 bases massively parallel sequencing on HiSeq 2000 (Illumina).

Bioinfomatics analysis

Base calling was performed using the Real-Time Analysis software sequence pipeline (Illumina, RTA v1.12.4.2) with default parameters. Sequence reads were mapped to the human genome build (hg19/GRCh37) using Elandv2e (Illumina, CASAVA1.8.2) allowing multi-seed

and gapped alignments. The duplicated reads were removed. CASAVA1.8.2 was used to call single-nucleotide variants (SNVs) and short insertions/deletions (max. size is 300nt), taking into account all reads per position. SNVs and indels with Q(SNPs) < 10 and Q(Indel) < 20, or regions with low mappability (QVCutoff < 90) were filtered out. The frequency with which single base differences were expected between two unrelated haplotypes (Theta parameter) was 0.01, this frequency was set to 0.001 for indels. Variant annotation took into account data available in dbSNP (dbSNP132), the 1000 Genomes Project (phase1_release_v3.20101123), Hapmap CEU (version27), the Exome Variant Server (ESP6500SI-V2-SSA137) and from an in-house database. Genetic variation annotation was realized from IntegraGen in-house pipeline.

In order to identify the germline and somatic variants, we considered that a variant is germline if its frequency is greater than 20% in normal tissue. Then to ensure only high-confidence transitions calls, we've considered as tumor specific variants only bases with a frequency greater than 5% in tumor tissue and with a frequency less than 1% in normal tissue. The tumor specific transitions were selected to identify the mutation signature and we used the stratification by transition contexts into a set of characteristic patterns as described by Alexandrov et al. (Alexandrov et al., 2013). This classification of SNVs is based on six base substitutions within tri-nucleotide sequence contexts including the bases immediately at 5' and 3' of each mutated base. Six base substitutions (C>A, C>G, C>T, T>A, T>C, and T>G) with 16 possible combinations of neighboring bases result in 96 possible mutation types. The signature obtained was compared to signatures catalogued in the COSMIC database (2017-June).

In order to select neoantigens, others filters were applied. Thus, out of around 50000 variants issued by the variant caller (CASAVA1.8.2), there were 2585 variants from Hg19 reference in tumor cells including 758 coding variants. Among coding variants, 442 missense variants from

hg19 reference in tumor cells, and finally 52 variants were annotated as somatic (ie tumor specific), corresponding to potential neoantigens.

Epitope predictions and peptide libraries

Epitope predictions were performed using Immuneepitope (NetMHCpan 3.0) and Syfpeithi. A list of predicted epitopes was obtained and all mutated peptides with a score ≤ 12 and a percentile rank ≥ 20 respectively were synthesized by Proimmune.

Tandem Mini Genes (TMG) - transfected cell lines

cDNA encoding 35 amino acids (17 amino acids at each side of the mutation) were selected to design TMG. A TMG is composed of 5 cDNA sequences in tandem in an expression vector (pcDNA3.1-). SiHa cell line was stably transfected with TMG (Qiagen Effectene transfection reagent kit 301425) and used to assess the specificity of neopeptide-specific clones.

Assessment of spontaneous antigen-specific T cell response in cancer patient

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Eurobio) and plated at 2.10^6 cells per well in a 24-wells plate in RPMI 10% human serum with the mixture of the four pools of peptides (2 µM) as previously described.(Godet et al., 2012) Recombinant interleukins, IL-7 (5ng/mL; Peprotech, 200–07) were added at day 1 and IL-2 (20UI/mL; Novartis) at days 3 and 6. Specific responses were assessed at day 13 by IFN-γ ELISPOT (DIACLONE ELISpot kit 856 051 020P).

Briefly, PBMC (1.10^5 per well) were cultured on anti-human IFN- γ monoclonal antibody- coated ELISPOT plate with each peptide (2μ M) in Xvivo 15 medium (Lonza) for 18h at 37°C. Cells cultured with medium alone or PMA (100ng/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (10µmol/L; Sigma-Aldrich) were used as negative and positive controls, respectively. The IFN- γ spots were revealed following the manufacturer's instructions. Spotforming cells were counted using the C.T.L. Immunospot system (Cellular Technology Ltd). Responses were considered as positive if spot numbers were superior to 10 and more than twice the number of background spots.

CD4 T-cell clones isolation and amplification

Specific T-cell clones of mutated peptide 49 were sorted after IFN- γ T cell sorting according to manufacturer's instruction after 6h of mutated peptide 49 stimulation (Miltenyi Biotec, 130-054-201). IFN- γ secreting T cells were cloned by limit dilutions and amplified after stimulation by PHA in presence of 35Gy irradiated allogeneic PBMCs and 150UI/mL of IL-2 according to previously described procedure.(Godet et al., 2012)

Functional assessment of CD4⁺ T cell clones

Functional analyses of neoantigens-specific CD4⁺ T-cell clones were performed by using intracytoplasmic IL-2 and IFN- γ staining (ICS). Briefly, after a 14h stimulation period with or without 2 μ M, T cells were labeled with fixable viability dye (FVD) (eBioscience, 65-0865-14), anti-CD3 (BD Biosciences, 558117), anti-CD4 (Diaclone, 954.031.010), anti-IFN γ (BD Biosciences, 554702) using Cytofix/CytoPerm KIT (BD Biosciences, 554714). Stained cells were acquired on a BD FACS Canto II (BD Biosciences) and analyzed with the BD FACS DIVA software.

The HLA restriction of the specific TCR was determined with CD4+ T cell clones treated with 10μ g/mL anti-HLA-DP (B7/21) (Leinco, H260) or anti-HLA-DQ (Biorad, MCA3796) or anti-HLA-DR (L243) (BD Biosciences, 555809) antibodies for 30min before addition of 2μ M of neopeptides for 14h before IFN- γ ICS.

To assess the avidity of T cell clones, 1.10^5 T cell were culture with 1.10^5 peptide loaded B-EBV cells (HLA-DRB1*1501 and HLA-DPB1*0401) for 14h before IFN- γ ICS.

To study the processing and natural recognition of mutated peptide 49 by T cell clones, transfected-tumor cell line lysate was loaded on immature MoDC derived from healthy donors. DC were obtained from monocytes cultured for 5 days with 1000 UI/mL of IL-4 (Peprotech 200-04) and GM-CSF (Peprotech 300-03). Transfected- SiHa cell lysates (20.10⁶ cells/ml) were

loaded on immature MoDC for 24h at 37°C. Lipopolysaccharide (LPS ; Sigma, L2630) 1 μ g/ml was added as a maturation signal for the last 6h of culture. After PBS 1X washing, mature loaded-MoDC were cultured with peptide 49-specific T cell clones at a 1:1 ratio for 18h at 37°C. MoDC loaded with WT or mutated peptide 49 (2 μ M) were used as negative and positive control respectively. IFN- γ secretion was assessed by ELISA (Diaclone ref 950.000.192) and acquired on a spectrophotometer (Tecan, XFluor4) according to manufacturer's instructions.

Acknowledgments:

We would like to acknowledge Antoine Baumann, Inès Saizonou and Dr Sophie Felix from the pathology department of the University Hospital of Besançon for the selection of histology images.

Authors are supported by grants from the Conseil Régional de Bourgongne Franche-Comté, the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021).



Figure 1. Patient's history.

Timeline of diagnosis and treatment of HCC patient showing MRI, Scanner imaging and alpha fetoprotein (AFP) level at several times of pathology history.



Figure 2. Mutations in patient's hepatocellular carcinoma.

Identification of tumor-specific mutation (a). The flowchart for algorithms identifying tumor-specific neopeptides. Pattern of the signature of the mutational processes in HCC exome (b). Signature were identified with pattern of substitutions for signature. Mutational signature Displayed based on an equal trinucleotide frequency. The mutational Signature is displayed using a 96 substitution classification defined by the substitution class and the sequence context immediately 3' and 5' to the mutated base. The probability bars for each of the six types of substitutions as well as the mutated bases are in the middle of two others. The mutation types are displayed on the horizontal axes while vertical axes depict the percentage of mutations attributed to each.



Figure 3 : Memory T cell responses specific of tumor-associated neopeptides . The secretion of hIFN- γ in patient's PBMCs was assayed by ELISpot after 12 days of stimulation by four pools of mutated peptides (a.), or individual peptides for the positive pools (b., c. and d.) (2µM) restricted by HLA-DRB1*1501.



Figure 4: Memory T cell responses specific of tumor-associated neopeptides .

The secretion of hIFN- γ in patient's PBMCs was assayed after 12 days of stimulation (2 μ M) by mutated or corresponding WT peptides represented in scatter diagram (A.) or with wells of Elispot hIFN- γ (b.). The predicted binding score is represented in c., d. and e. for all peptides, comparing the WT and the mutated peptide (grey circle corresponding to immunogenic neopeptides with 49 for HELZ2^{V241M}, 51 for IL-1b^{S230F} and 53 for MLL2^{A4802S}, on HLA-DRB1*1501 (c.), HLA-DPB1*0401 (d).



Figure 5: Characterization of 49 neopeptide-specific T cell clones.

In a. it showed the getting strategy for the intracellular and cell surface staining (b.) with a marker of viability (fixable viability dye), CD3, CD4, IFN-g and IL-2 (c.). In c. the secretion of IFN-g and IL-2 by CD4+ T cell clones were analyzed, comparing the response after a stimulation during 14h, with the wild type (left) and the mutated peptides (right) (2 μ M) of HELZ2. In d. T cell clone specific of neopeptide 49 from mutated HELZ2^{V241M} protein has been test for their restriction with several blockade antibodies (anti- HLA-DP, -HLA-DQ, or with a control isotype antibody. And in e. the avidity of T cell clone for its specific neopeptide 49 (circle empty) were tested with several concentrations, from 100 to $1.10^{-7} \mu$ M) versus the same concentrations of the wild type peptide (black triangle). Finally, T cell clone specific of mutated peptide 49 were cultured with MoDC from healthy donors' PBMC loaded over night with cellular lysate of SiHa transfected with Tandem MiniGene (TMG) -1 or -2. TMG-1 corresponding to cDNA coding amino acid sequences containing peptides from pool-1, and similarly for TMG-2 containing among others mutated sequence coding mutated peptide 49. The supernatant were assayed by IFN-g ELISA TMG-1 is negative control. In f. two experiments were showed with two different healthy donor to generate MoDC

Tableau 1 : List of predicted peptides.

Candidate peptides from mutated proteins are selected for their predicted capacity to bind HLA-DRB1*1501. These 20 candidate neopeptides are divided into 4 pools, from 1 to 4. Their predicted capacity to bind HLA-DPB1*0401 has been added.

					Syfpeithi prediction	Immuneepitope prediction			
						HLA-DRB1*1501		HLA-DPB1*0401	
	Peptide names	Gene names	Protein names	Mutated / WT peptides	Mutated / WT binding score	Mutated / WT percentile rank	IC50 medium Mutated/WT	Mutated / WT percentile rank	IC50 Mutated / WT
Pool-1	42	ANKRD42	Ankyrin repeat domain-containing protein 42	TLQIML(Q/R)SGVDPSVT	24 / 24	11.84/11.73	609/603	54.95 / 65.07	5208.26 / 7723.77
	43	C5orf60	Putative uncharacterized protein C5orf60	QAEVGEWLRI(R/G)NKYI	30 / 30	2.33/2.36	29/60	28.54 / 41.39	1397.63 / 2844.53
	44	CRAMP1L	Protein cramped-like	Y(K/E)HGKDFEAIQNNIA	24 / 24	11.61 / 13.55	448/448	58.68 / 60.22	6033.25 / 6411.36
	45	DBC1	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	ISDVQVF(W/G)YSLRFNA	24 / 24	6.47 / 1.91	395/421	0.42 / 5.41	15.91 / 121.04
	46	DCAF4L2	DDB1- and CUL4-associated factor 4- like protein 2	SLSIHAYHSFST(S/G)LS	34 / 34	0.80 / 0.83	73/75	10.05 / 13.29	258.34/381.51
	47	FAT1	Protocadherin Fat 1	LNRKILYSLIDSAD(E/G)	20 / 20	10.06 / 8.41	516/435	11.41 / 12.35	303.33 / 338
Pool-2	48	GABRG2	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2	AVPART(Y/S)LGITTVLT	24/14	7.39 / 32.28	384/2169	22.89 / 60.73	928.233 / 6542.48
	49	HELZ2	Helicase with zinc finger domain 2	R(M/V)QAASFGTFEQWVV	24 / 24	9.04 / 9.04	335,5/467	6.79 / 5.82	158.89/134.93
	50	HHIPL1	HHIP-like protein 1	AAQ(L/P)EVYALGVRNMW	24 / 14	9.46 / 24.22	487/1420	23.48 / 41.61	966.72 / 2870.41
	51	IL1B	Interleukin-1 beta	EFE(F/S)AQFPNWYISTS	26 / 18	0.62 / 18.71	47/322	3.36/13.61	67.02 / 396.15
	52	JARID2	Protein Jumonji	HKCI(C/Y)KGRSVSLTTF	24 / 24	10.98 / 6.07	1698/619	56.46 / 41.77	5545.46/2893.95
Pool-3	53	MUD	Histone-lysine N-methyltransferase 2D	(S/A)GHLLLQKLLRAKNV	20 / 20	2.61 / 2.61	163/162	9.30 / 9.17	235.12/232.24
	54	IVILLZ		MV(V/A)VAELLSMKIPNS	24 / 24	2.28 / 3.75	152/160	17.21 / 25.31	562.78 / 1104.31
	55	MMP3	Stromelysin-1	(S/R)GEILIFKDRHFWRK	20 / 20	0.52 / 0.47	40/39	12.22 / 11.54	333.19/308.84
	56	OR51V1	Olfactory receptor 51V1	TMAFDRYIAICNP(V/L)R	32 / 32	4.19 / 4.55	319/298	17.17 / 12.54	561.55 / 347.5
	57	PCDHGB7	Protocadherin gamma-B7	LFLLAVILAIAL(C/R)LR	24 / 24	0.8/0.73	73/53	14.75 / 10.17	446.73 / 262.82
Pool-4	58	PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic	VARIESK(M/T)VIVTQEQ	20/20	8.01 / 8.01	198/397	41.52 / 59.98	2857.67/6347.11
	59	RHOBTB1	Rho-related BTB domain-containing protein 1	SVQPG(H/P)FRTLLQFLY	24 / 24	10.98 / 10.98	264.5/398	1.80 / 2.92	39.88 / 56.26
	60	SLC38A4	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4	DELLHAYS(E/K)VYTLDI	30 / 30	5.76/1.5	183/112	13.13 / 15.75	371.63 / 498.26
	62	PNPLA7	Patatin-like phospholipase domain- containing protein 7	A(S/A)AGPLLKRSHSVPA	4/4	8.83 / 8.81	456/455	77.07 / 76.34	11976.89/11659.54

Supplementary data Tableau 1 : List of non silent selected mutation from tumor cell of patient's HCC.

				COSMIC database		
Gene name	Reference name	Mutation	WT Amino Acide sequence	Number of mutated / tested samples for each mutated genes	Pourcentage of each mutated genes	Specific mutations found
ADAMTS13	NM_139025	G845V	GGAGLALENETCVPGADGLEAPVTE(G)PGSVDEKLPAPEPCVGMSCPPGWGH	286 / 29588	0.97%	0
ADAMTS15	NM_139055	G661A	VDGTLCSPDSTSVCVQGKCIKAGCD(G)NLGSKKRFDKCGVCGGDNKSCKKVT	231 / 29565	0.78%	0
ANKRD42	NM_182603	R119Q	QDDRGCTPLHLAATHGHSFTLQIML(R)SGVDPSVTDKREWRPVHYAAFHGRL	79 / 29380	0.27%	1
BAI3	NM_001704	C1079R	LDKKLKHRAGQMSEPHSGLTLKCAK(C)GVVSTTALSATTASNAMASLWSSCV	823 / 30208	2.72%	0
C5orf60	NM_001142306	G86R	EPSSVPPREEDSENDQAEVGEWLRI(G)NKYITLKDYRILLKELENLEIYTFL	39 / 29393	0.13%	0
CADPS	NM_003716	A318V	NACQLDNPDEQAAQIRRELDGRLQM(A)DQIARERKFPKFVSKEMENMYIEELK	399 / 29568	1.35%	0
CCDC79	NM_001136505	Q653R	EDRYKSELRKSLICNKKILLTPRRR(Q)RLSNESTTPGGIKKRRIRKNFTEEE	87 / 29289	0.30%	0
0.077	ND (006420	W474L	LCDNAGFDATNILNKLRARHAQGGT(W)YGVDINNEDIADNFEAFVWEPAMVR	77 (20270	0.0.00	0
CCI7	NM_006429	W474C	LCDNAGFDATNILNKLRARHAQGGT(W)YGVDINNEDIADNFEAFVWEPAMVR	///29379	0.26%	0
CKAP5	NM_001008938	L1948M	GNTNGEEVGPSVYLERLKILRQRCG(L)DNTKQDDRPPLTSLLSKPAVPTVAS	304 / 29380	1.03%	0
CLMN	NM_024734	K488E	VLAVEVAEEKEQKQESSKIPESSSD(K)VAGDIFLVEGTNNNSQSSSCNGALE	233 / 29468	0.79%	1
COL16A1	NM 001856	G611A	PGLPGRAGVPGLKGEKGNFGEAGPA(G)SPGPPGPVGPAGIKGAKGEPCEPCP	312 / 29436	1.06%	0
CRAMP1L	NM 020825	E180K	EGKKVRRQWESWSTEDKNTFFEGLY(E)HGKDFEAIQNNIALKYKKKGKPASM	212 / 29290	0.72%	0
DBC1	NM 014618	G659W	GOGPVDLSDPSKRQFYIKISDVQVF(G)YSLRFNADLLRSAVQQVNQSYTQGG	454 / 29444	1.54%	0
DCAF4L2	NM 152418	G203S	CSFQIPDAWSCAWSLSIHAYHSFST(G)LSQQVLLTNVVTGHQQSFGTSSDVL	394 / 29384	1.34%	0
DCST2	NM 144622	M221V	DVCNSELGNPYLKCARVFDDAKDSC(M)MVIPQAYHLCYVLMPFKLALCGLAS	157 / 29379	0.53%	0
EXTL3	NM 001440	D746Y	EKNSLNNRFLPWNEIETEAILSIDD(D)AHLRHDEIMFGFRVWREARDRIVGF	191 / 29379	0.65%	0
FASN	NM 004104	R425W	VHILLRPNTOPPPAPAPHATLPRLL(R)ASGRTPEAVOKLLEOGLRHSODLAF	480 / 29380	1.63%	1
FAT1	NM 005245	G3170E	TRVOATDADAGLNRKILYSLIDSAD(G)OFSINELSGIIOLEKPLDRELOAVY	1169/30688	3.81%	0
GABRG2	NM 198903	\$306Y	IPCTLIVVLSWVSFWINKDAVPART(S)LGITTVLTMTTLSTIARKSLPKVSY	267 / 29668	0.90%	0
GLIPR1L1	NM 152779	M58V	FIDNCIEAHNEWRGKVNPPAADMKY(M)IWDKGLAKMAKAWANOCKFEHNDCL	58/29539	0.20%	0
HELZ2	NM 001037335	V241M	PGRLYARGERFRVPSSTADFOVGVR(V)OAASFGTFEOWVVFDFGRRPVLLOK	446 / 29383	1.52%	0
HHIPI 1	NM_001127258	P386I	VDRKERGI PYGIPPDNPFVGDPAA0(P)FVYAI GVRNMWRCSEDRGDPSSGTG	128 / 29357	0.44%	0
II 1B	NM_000576	\$230E	NYPKKKMEKREVENKIEINNKI EEE(S)AOEPNWYISTSOAENMPVEI GGTKG	94 / 29812	0.32%	0
IL 6R	NM 181359	\$304G	IHDAWSGI RHVVOI RAOFFEGOGEW(S)FWSPFAMGTPWTFSRSPPAFNEVST	5/29471	0.02%	0
IRF4	NM_002460	G375S	LERDOTCKI EDTOOELSELOAEAHH(G)RSLPREOVTLCEGEEEPDPORORKI	4/30857	0.02%	0
IARID2	NM_004973	¥815C	FAOFKEVVKEFFEDKGVI NDEHKCI(Y)KGRSVSI TTEVRTARNIMSMCESKE	290 / 29646	0.98%	0
	NM_020803	P3001		124 / 20370	0.78%	0
KRT30	NM_213656	V298E	EPIMETNRKDVEOWENTOIEELNOO(V)VTSSOOOOCCOKEIIELRRSVNTLE	1/3 / 20200	0.42%	0
KKI37	NM_003482	448025	REANGEPIGAPGTSNHLLLAGPRSE(A)GHLLLOKLLRAKNVOLSTGRGSEG	1437 29290	4.80%	0
MLL2		A46023	CKCSEVSVMLTVSAAAAKNI NGVMV(A)VAELI SMKIDNSVEVLEDESDADAG	1633 / 34019		0
MMP3	NM 002422	R3038	EPVPPEPGTPANCDPALSEDAVSTI (R)CEILIEKDRHEWRKSLRKI EPELHI	1/15 / 20550	0.49%	0
MUC16	NM_024600	T27128	MSETSNCDALVLYTVSNDDSSDCI/TVOCVTESDLHDSSTSDSVIVADDNT	2225 / 20047	7.410/	0
NIN	NM 182044	E12/135	SEKKODI JEDVSVI KKKI KMI EDIDE) ASDKVKI I VEDVSDENDCI OFEI DM	22237 30047	1.00%	0
OP51V1	NM 001004760	L1243D	UCI SEMESSVI I TMAEDDVIAICND/I DVSSII TNSDIIKIGI THCDSEEE	167 / 20357	0.57%	0
ORSIVI OP6N2	NM_001005278	\$201N		180 / 20357	0.57%	0
PCDUGB4	NM_032008	G378P	I IMEDAEL CTHIALL KVPDKDSPHN(C)EVTCKLECDVPEKILTSSPNTVKLV	293 / 29357	1.00%	0
PCDUGB7	NM_018027	P714C	OEVI VVALALISVI ELLAVILALAL (D)L DOSESPTACDCEESVI CSKSCDVC	293/29209	0.02%	0
DCV1	NM 002501	T02M	DDI KKYDNOWI ALTDDDDVADIESK/TWUTGEODDTVDIDKTCL SOLCDWM	209/29313	0.92%	0
PUNE2	NM_015225	02587D	KREAK IDING WEALIDFRD VARIESK(I) VIV IQEQRDI VFIFKIGESQEGRWW	247/29473	0.04%	0
PADICAD2	NM_015025	Q236/F	DETDCD A OOL OD KD HICNDIVA HEO/E)ENTDEVDDMIA SNELHA XIV/V/OVET	140 / 20200	0.51%	0
RAFIGAE2	NM 144480	EJUOK	I SI SI DIEDCWMEWI SODIAL DODOCIWITOTSDAD KDITHA KVOCACOL DI S	216/29290	0.31%	0
RUSS DUODTD1	NM 014926	D410H	LSLSLFIFFOWMEWLSFDIALFRED(E)WTQTSFARRENTHARVQUAUQLELS MOVNDISKDMCDMTUVDMDASVODC/DEDTLLOELYTCOLDEKEKDLVCLAO	162/20472	0.73%	0
SI C28A4	NM 001142824	F410H	VLLAALECVLTEVCEVEDELLHAVS(K)VVTLDIDLLMVDLAVLVAVTLTVD	102/29472	0.55%	0
SLC30A4	NM 002177	D410V	ILLAALI'U ILIFI UEVEDELLAAI 3(K) VII ILDIFLLIVI VKLAV LVAV ILI VPI WEVE VVOMEEVUVETVAVETI ENEAN (D) DAI EDELLA EAN VMOOLDNDVD/DM	202/20847	0.65%	0
	NM_000177	D4101	VKKG I I QWKKVVKI VAVKILKNEAN(D)PALKDELLAEANVMQQLDNP I IVKM	202/3084/	0.05%	0
TNDC19	NM 001020405	1 1 2 2 M	UNDET UT VEFTERIKTIAAAALAAIVINU(K) MIWUKEVKVINWAI IPSSQKKD1555	12/29380	0.23%	0
TDDV5	NIM_01080495	E123M	A ST AT DESSE SDEA SOSSELIDOWEILD ONTE CHENIL OF DE CODODED VILLE	422 / 29289	1.44%	0
IKPVJ	NNI_019841	5/19G	ASLALF I SSLSKIASUSSSHKUWEILKUN I LUHLNLULNL(S)EUDUEEV YHF	527729469	1.11%	0
LINF4U8	NM 152296	1340L	VULLERAN I LEVANUSUFF I LSKSP(F)UFAUSSPKUUKK I KUUEUUKAFLUL	130 / 2940/	0.55%	0
FINPLA/	INIVI_132280	A 3433	EEEKLKKPPKLQESUDSDHUUUKPA(A)AUPLLKKSHSVPAPSIKKQILEELE	249/29296	0.85%	0
SUNI	INM_0011/1944	E679Q	LKDLQLQLKNVTHHVSVTKQLPTS(E)AVVSAVSEAGASGITEAQARAIVNS	182/30/32	0.59%	0
GALNT15	JNM_054110	w204C	PLCLQQHPQDSLPTASVILCFHDEA(W)STLLKTVHSILDTVPRAFLKEIILV	228/30/32	0.74%	0

Deuxième partie:

Étude de la signature mutationnelle et de l'induction de néoantigènes par un traitement par Oxaliplatine

Study of mutational signature and neoantigens immunogenicity induced by Oxaliplatin treatment

<u>Vrecko Sindy</u>¹, Guenat David⁶, Royer Bernard^{1,2}, Boidot Romain⁴, Mougey Virginie¹ Adotévi Olivier^{1,5}, Borg Christophe^{1,5}, Godet Yann¹

Abstract

Cancer cells evolve by undergoing DNA mutations. These non-synonymous mutations could be a source of mutated peptides (neopeptides), which are processed, presented by HLA molecules on cancer cells and recognized by CD4⁺ or CD8⁺ T cells. The recognition of HLA-neopeptide complex by TCR could lead cancer cells. Neopeptides are only expressed by cancer cells, making them good targets for cancer immunotherapy. Several cancer therapies, modulate the immune system, among which alkylating agent known to induce mutations in specific DNA sequences (AG, GG, 5'AG and 5'GG), creating a mutational signature.

In addition to the cytotoxic chemotherapy effect, we purpose that Oxaliplatin, an alkylating agent, could induce non-synonymous mutation in cancer cells, which lead to immune responses against neoepitopes.

To study the existence of immunogenic neoepitopes, after treatment by Oxaliplatin, we used an RNA sequencing from non-treated and Oxaliplatin-treated HT29 cells (HT29-OxaR). In order to identify the missense mutations potentially immunogenic, we generated a list of predicted neoantigens. Using computational algorithms, we determined the HT29 cells HLA-binding potential of each of these neoantigens.

Preliminary results show the presence of mutational signature corresponding to Oxaliplatin treatment in HT29 cell line. Moreover, we identified 26 neopeptides potentially immunogenic from 18 225 variants in HT29-OxaR.

This study could add an argument in favor of combination of immunotherapy, such as anti-PD-1 or anti-CTLA-4, with alkylating agent. Moreover, we will study the presence of immunogenic peptides induced after treatment by Oxaliplatin, in several models.

Key words: Oxaliplatin, Mutations, Neoantigens

Introduction

Désormais, les chimiothérapies ne sont plus toutes considérées comme immunosuppressives, mais au contraire, quelques-unes peuvent avoir des propriétés immunostimulantes. L'équipe de L. Zitvogel notamment, a identifié pour certaines chimiothérapies, des effets permettant l'activation des réponses immunitaires antitumorales. En effet, l'Oxaliplatine peut induire une apoptose immunogène (Obeid et al., 2007; Tesniere et al., 2010), ou augmenter l'antigénicité des cellules tumorales en augmentant par exemple l'expression de l'antigène CEA, lorsque ce traitement est associé au 5-FluoroUracile (Galluzzi et al., 2012, 2015; Prete et al., 2008) (Fig. 21). Ainsi, l'Oxaliplatine est l'une d'elle et est utilisée pour différents types de cancers, principalement du côlon, de l'estomac et du pancréas.



Figure 21 : Des mécanismes d'action de l'Oxaliplatine

L'Oxaliplatine va ajouter des groupements alkyles sur les bases des acides nucléiques notamment, créant alors des ponts inter et intra brins d'ADN, inhibant alors la réplication de l'ADN et induisant la réparation de l'ADN qui pourra conduire à la création de mutation. Les mutations induites vont pouvoir conduire à la création de néoépitopes potentiellement reconnus par les lymphocytes T. L'Oxaliplatine peut aussi modifier la quantité d'épitopes présentés en surface pour un antigène. L'Oxaliplatine va aussi induire une apoptose immunogène, passant par une externalisation de la calréticuline en surface, une libération d'ATP et d'HMGB1 dans le milieu extra cellulaire, permettant le recrutement et la maturation de cellules dendritique. D'après (**Starobova and Vetter, 2017; Galluzzi et al., 2012**)

Cette chimiothérapie est initialement connue pour être un agent alkylant. L'Oxaliplatine va induire la fixation de groupements alkyl (C_nH_{2n+1}), qui peuvent alors former des ponts interet intra-brins entre les bases alkylées de l'ADN entre autres. Ces ponts bloquent la réplication de l'ADN et peuvent conduire à la mort cellulaire. L'ajout des adduits par l'Oxaliplatine se fait préférentiellement aux atomes N7 de la Guanine, mais aussi dans une moindre mesure aux N7 et N1 de l'Adénine (Wang et al., 2016). Les agents alkylants vont alors ajouter des adduits alkyls à ces atomes d'azote (Fig. 22). Ces adduits vont entrainer des modifications conformationnelles au niveau de l'ADN double brin, en créant des ponts inter-brins ou intra-brins, et empêchent la transcription correcte de l'ADN (Fichtinger-Schepman et al., 1985; Saris et al., 1996).



Figure 22 : La représentation chimique des adduits d'Oxaliplatine et l'exemple d'un pont interbrin d'ADN.

Cependant, les dommages au sein de l'ADN peuvent être soit corrigés soit bypassés. En effet, plusieurs mécanismes peuvent se mettre en place après l'ajout d'adduits de Platine à l'ADN (Pt-ADN). Les adduits d'oxaliplatine vont pouvoir entrainer la mise en place de systèmes de réparation des dommages à l'ADN, par le système de réparation par excision de nucléotides, qui intervient surtout pour les réparations intra-brins, par le système de réparation par recombinaison ou aussi par la synthèse d'ADN par translésion, qui interviennent surtout pour des lésions inter-brins (Silva et al., 2005). Plusieurs ADN polymérases (ADN_{pol}) peuvent être impliquées pour la réplication par translésion ; l'ADN_{pol} η , l'ADN_{pol} μ , l'ADN_{pol} μ est la polymérase qui va induire le plus de mutations. Le système de réparation des mésappariements ou *mismatch repair* (MMR) peut aussi être associés à une augmentation des mutations, comme

des défauts dans le système MMR associé à une augmentation de l'effet mutagène d'autres agents alkylants (Chaney et al., 2005). Ainsi lors de la réparation et la réplication de l'ADN endommagé, ces systèmes de réparation peuvent induire des mutations génétiques, principalement des substitutions de bases d'ADN (Pillaire et al., 1995). Si la cellule possède trop de dommages à l'ADN, alors celle-ci est incapable de réparer son ADN et peut alors entrer en apoptose. Toutefois, certaines cellules mutées après traitement par Oxaliplatine vont persister et peuvent notamment devenir résistantes au traitement.

Des études ont démontré que l'ajout des adduits de Platine à l'ADN a lieu dans des séquences particulières de l'ADN. En effet, dans 60% à 65% des cas de mutations, les Pt-ADN sont situés sur des séquences GG et pour 20 à 25% des cas sur des séquences AG (Eastman, 1987). D'autres études ont déterminé d'autres séquences ciblées induisant des mutations en 5'AG ou 5'GG (Raymond et al., 1998; Woynarowski et al., 1998; Silva et al., 2005; Chaney et al., 2005).

Le traitement par Oxaliplatine pourrait induire l'augmentation de la charge mutationnelle des cellules cancéreuses (McGranahan et al., 2016), par l'ajout de groupement alkyl au niveau de séquences particulières de l'ADN (Fig. 21 et 22). Notre hypothèse d'étude pour ce travail est que l'induction de ces mutations au niveau de sites précis de l'ADN, partagés par la majorité des patients, pourrait s'accompagner de la création de néoépitopes potentiellement immunogènes.

Résultats

Ainsi pour cette étude, une lignée de tumeur du colon (HT29) a été traitée par Oxaliplatine, jusqu'à devenir résistante à ce traitement, par l'application de doses croissantes et répétées d'Oxaliplatine. Ensuite, un séquençage d'ARN a été réalisé sur la lignée HT29 Wild Type (HT29-WT), ainsi que sur la lignée HT29 résistante à l'Oxaliplatine (HT29-OxaR).

La première partie de ce travail a permis d'analyser le type de mutations présentes dans chaque lignée, de les comparer et d'établir un profil mutationnel. Ces observations ont pour but d'analyser l'existence d'une signature mutationnelle par traitement à l'Oxaliplatine. La seconde partie concerne l'étude de l'implication des mutations dans l'immunogénicité de ces cellules tumorales.

Identification des mutations apparues après traitement par Oxaliplatine

Plusieurs étapes de sélection ont permis d'identifier 12 429 mutations spécifiques des cellules tumorales HT29-OxaR (Fig. 23), dont 11 715 *Single Nucleotide Variants* (SNV)

correspondant à des mutations ponctuelles non silencieuses. Ensuite, un seuil a été établi afin de sélectionner uniquement les mutations somatiques ponctuelles non silencieuses retrouvées dans au moins 10 reads. Cette étape permet de s'affranchir d'éventuelles erreurs de séquençage ou de problèmes sur la qualité de l'échantillon.



Figure 23 : Sélection des SNV spécifiques des mutations de HT29-OxaR.

Les résultats d'un séquençage d'ARN de HT29WT et HT29-OxaR ont été analysés pour identifier les mutations spécifiques de HT29-OxaR et parmi les mutations somatiques non silencieuses, retrouvées dans au moins 10 reads.

Après plusieurs étapes de sélections (Figure 23), les mutations somatiques correspondant à des substitutions non silencieuses ont pu être sélectionnées à partir des séquençages d'ARN des lignées HT29WT et HT29-OxaR. Finalement, 180 mutations ont été identifiées pour les cellules résistantes à l'oxaliplatine.

Les SNP identifiés comme spécifiques de la lignée HT29-OxaR permettent d'analyser la distribution des mutations somatiques ponctuelles non silencieuses, en les comparants aux SNP de la lignée HT29 WT. Cette analyse, sur le brin sens et anti-sens, nous permet d'étudier une potentielle modification du profil de mutation, après traitement par Oxaliplatine. Chaque type de substitutions a été reporté ici en fonction de leurs pourcentages d'apparition dans leurs lignées respectives.



Figure 24 : La distribution des mutations SNV entre la lignée HT29WT et HT29-OxaR.

Le pourcentage de chaque type modification d'acides aminés est comparé entre les deux lignées HT29 WT (Marron) et HT29-OxaR (Bleu).

Tout d'abord l'étude de la distribution des substitutions entre les deux lignées a été réalisée, en comparant la fréquence d'apparition de chaque possibilité (Fig.24).

Ainsi, les données montrent qu'initialement, la lignée HT29, avant traitement par Oxaliplatine, présente de forts taux de substitutions de type C>T et T>C, supérieurs à 30%. Après traitement, une augmentation du taux de substitutions de Cystéine en Adénine C>A a pu être observée, représentant 20% des substitutions. De plus, après traitement d'autres modifications ont eu lieu avec notamment une forte augmentation du taux de substitutions de types T>A, quatre fois supérieur aux cellules non traitées et dépassant 10% des substitutions.

Ensuite les mutations de la lignée HT29-OxaR, décrites comme spécifiques des agents alkylants ont été étudiées par comparaison à la lignée HT29-WT. Ainsi, la répartition des mutations a pu être analysée en s'intéressant à des motifs particuliers de l'ADN, comme les mutations somatiques ponctuelles non silencieuses situées dans les motifs AG ou GG, mais aussi ayant lieu en 5' de ces deux motifs (5' AG et 5'GG) déjà décrites comme étant des régions particulièrement ciblées par l'Oxaliplatine (Fig. 25) (Silva et al., 2005).



Figure 25 : La distribution des mutations somatiques non silencieuses situées dans les séquences privilégiées par l'alkylation de l'Oxaliplatine.

Le pourcentage des mutations AG GG ou en 5' de ces motifs a pu être étudié et comparé entre les deux lignées HT29WT (marron) et HT29-OxaR (Bleu). Différentes séquences d'ADN contiennent les motifs GG, AG ou en 5' de GG ou AG. Deux motifs peuvent être retrouvés à la suite de la séquence d'ADN, comme GGGG qui contient un motif GG mais aussi un motif en 5'GG, ou encore AGGG, qui contient lui aussi le motif 5'GG et le motif AG. Le nucléotide N correspond à n'importe quelle base, différente de A ou G.

Cette analyse nous permet d'observer que les mutations de la lignée HT29 sont en fortes proportions dans les motifs AG et GG et très faiblement dans les motifs en 5' de ceux-ci. Après traitement par Oxaliplatine, les résultats montrent une augmentation des taux de substitutions de type G>A et G>T pour le motif GG dans les séquences ; G[G>A]GN, G[G>A]NN, G[G>T]NN, N[G>A]GN, N[G>T]GN et pour le motif AG, dans les séquences A[G>A]GN, A[G>T]GN, A[G>T]NN, A[G>T]NN. En revanche, de faibles augmentations des mutations pour les motifs 5'AG ou 5'GG ont été observées, pour les substitutions [A>C]AG, [T>C]AG, [T>A]AG, [C>A]AG, [G>A]AG et [T>A]GG. Les résultats confirment que les séquences AG et GG sont plus souvent mutées après traitement par Oxaliplatine, dans la lignée HT29, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Chaney et al., 2005; Silva et al., 2005).

Les mutations spécifiques à la lignées HT29-OxaR ont été utilisées pour analyser la présence d'une signature mutationnelle, en comparaison à la lignée HT29WT, en utilisant le modèle d'Alexandrov (Fig. 26) (Alexandrov et al., 2013). Ainsi, chaque mutation a été séparée en fonction de sa substitution, par exemple A>T ou A>G, mais aussi en fonction de sa base présente en 5' et en 3'. Ainsi, les proportions de chaque tri-nucléotide, contenant alors au centre la base mutée, sont analysées.





Le pourcentage des substitutions non silencieuses sont comparées entre les deux lignées HT29WT (marron) ou HT29-OxaR (bleu) en s'intéressant à des séquences tri-nucléotidiques, comportant la mutation entourée par une base en 3' et un en 5'. Ces trinucléotides sont répartis en fonction de la substitution C>A, C>G, C>T, T>A, T>C ou T>G.

Ainsi, l'analyse du profil de mutations spécifiques à la lignée HT29WT montre que ces substitutions correspondent presque exclusivement à des C>T et T>C, alors qu'après traitement par Oxaliplatine la lignée présente une diversification des mutations. En effet, une augmentation des mutations C>A et T>A, dépassant alors 1,5% de mutations, mais aussi une augmentation de certaines substitutions C>T et T>C ont pu être identifiées (Fig. 26). Le traitement par Oxaliplatine a entrainé une forte augmentation du nombre de substitutions C>A dépassant 2,5% pour les séquences ACC, CCT et GCT, alors que le taux basal de mutations dans la lignée HT29WT ne dépassait pas 1%. Concernant les substitutions C>T la lignée HT29WT, les taux de mutations les plus importants sont observés dans les motifs ACG, CCG et GCG et pour les substitutions T>C ce sont les motifs ATG, ATT, CTG et GTG retrouvés à plus de 1,5%. Pour la lignée HT29-OxaR, pour les substitutions C>T, les taux de mutations les plus importants sont observés respectivement à plus de 6 et 3,5%. Pour les substitutions T>C, le traitement n'a pas d'influence sur le taux de cette substitution, sauf pour les motifs TTA et TTT retrouvés à plus de 2%.

Cette analyse de la lignée HT29-OxaR a été utilisée pour étudier la présence potentielle d'une signature mutationnelle liée à un agent alkylant.

Ensuite, une dernière analyse des SNP de la lignée HT29 a été réalisée pour étudier la répartition des tri-nucléotides, contenant la base mutée, inspirée d'Alexandrov (Alexandrov et al., 2013). Cette analyse permet de cibler les mutations touchant particulièrement la Guanine (Fig. 27), puisque nos résultats montrent que cette base est le plus souvent impliquée dans ces mutations ponctuelles non silencieuses (Fig. 26 et 27).



Figure 27 : Le profil mutationnel des guanines, cibles de l'oxaliplatine, selon le modèle d'Alexandrov.

Les deux lignées HT29WT (marron) et HT29-OxaR (bleu) ont été comparées en s'intéressant surtout aux mutations touchant les guanines. La fréquence des mutations de la guanine située au centre des 16 trinucléotides possibles, ont été étudiées et réparties en fonction de la substitution G>A, G>T ou G>C.

Ces résultats montrent quelques différences de substitutions concernant la guanine, entre la lignée HT29WT et HT29-OxaR. Les substitutions G>A présentent un profil variable pour quelques séquences, en fonction de la lignée HT29WT ou HT29-OxaR étudiée. Par contre, après traitement par Oxaliplatine, la lignée présente une augmentation globale des mutations G>T. Pour la lignée HT29WT très peu de substitutions dépassent 2% sauf pour les substitutions G>A pour les motifs CGA, CGG et CGT. La lignée HT29-OxaR présente une augmentation des mutations dans les motifs AGC et AGG que ce soit des substitutions G>A ou G>T, mais aussi dans les motifs AGT, GGT, TGC et TGG pour les substitutions G>T.

Ainsi, cette analyse confirme que la lignée HT29 présente un peu plus de mutations des guanines dans les motifs AG ou GG après traitement par Oxaliplatine.

L'analyse des substitutions de la lignée HT29-OxaR comparée à celle de la lignée HT29WT, a permis de confirmer les données de la littérature, avec de plus forts taux de substitutions au niveau des Guanines, généralement situées dans les motifs AG ou GG. En effet, l'adduit de platine ajouté après traitement pas l'Oxaliplatine, entraine une mutation ponctuelle

de sa base complémentaire, la Cytosine. L'étude se porte désormais sur l'analyse de l'immunogénicité des mutations correspondant à la signature mutationnelle de l'Oxaliplatine.

Pour ce faire, le séquençage de l'ARN de ces deux lignées HT29 a permis d'étudier l'existence de néoépitopes potentiellement immunogènes, apparus après traitement par Oxaliplatine.

Identification de néoépitopes prédits pour être présentés par le CMH-I de la lignée HT29, apparus après traitement par Oxaliplatine

A partir du séquençage d'ARN, une étape supplémentaire a été utilisée pour la méthode de sélection. En effet, la sélection s'intéresse ici particulièrement aux mutations ayant lieu dans des séquences codantes pour une protéine (Fig. 28).



Figure 28 : Les étapes de sélections des néopeptides potentiellement immunogènes et présentés par le CMH de classe I, issus de la lignée HT29 après traitement par Oxaliplatine.

Ainsi, 26 protéines mutées, correspondant à des mutations missenses non silencieuses, ont été identifiées et sont spécifiques de la lignée HT29-OxaR. A partir de ces 26 protéines mutées, une prédiction in silico (Immuneepitope) a été réalisée afin d'identifier des peptides contenant la mutation et prédits pour être présentés par le HLA de la lignée, à savoir HLA-A*0101, -B*3501, B*4401 et –C*0401 (Fig. 28).

Tableau 1 : La liste des gènes identifiés comme mutés et spécifiques de la lignée HT29-OxaR, et les néopeptides correspondant prédits pour lier le CMH-I (HLA-A*0101, HLA-B*3501, *4403 et HLA-C*0401)

Genes	Sequences d'ADN: base mutée/WT	Peptides mutés/WT	Scores de liaisons prédits (Immuneepitope)	HLA	
ANKFY1	TC[A/T]GT	LTE(Q/L)MKLAN	2.05 / 1.6		
VPS33A	GC[C/A]CA	(V/G)LKQKVLDY	2.35/5.35		
NIPBL	GG[A/T]CT	KMNSDTV(V/D)Y	1.5/1.55		
TES	CT[A/C]TG	G(S/Y)DKLWHPA	0.5/13.2		
NCL	AC[C/A]CA	VTDRET(V/G)SS	1.15/1.25		
CSNK2A2	AC[C/A]GG	LTDFDI(L/R)FY	0.1/0.2	пLA-А [*] 0101	
ZMAT5	GC[T/A]AC	LSSAPS(C/S)RA	1.35/2.95		
SLCO1B3	AA[G/T]GG	NSVFFG(M/R)VY	0.4/1.1		
PLCH1	CC[T/A]TT	(M/K)MNNVTTDY	0.55/1.2		
EPB41L2	GT[C/A]CT	ELDKAQE(Y/D)I	3.75/9		
NIPBL	GG[A/T]CT	KMNSDTV(V/D)Y	2.7/5.1		
PLCH1	CC[T/A]TT	(M/K)MNNVTTDY	0.7/8		
NCL	AC[C/A]CA	T(V/G)SSKGFGF	6.2/12	UI A D*2501	
PPP6R3	AG[A/C]TC	FA(A / D)QDDIGN	1.1/2.4	пLA- Б ⁺ 5501	
CNOT8	TT[T/G]AT	FPSI(D / Y)DVKY	0.2/0.3		
PPP1R21	CT[G/T]TG	KPLLES(L/V)PY	0.4/0.5		
NCL	AC[C/A]CA	RET(V/G)SSKGF	0.25/0.25		
DNAJA1	GG[G/T]TG	KE(V/G)GAGGGF	0.35/0.85		
PPP6R3	AG[A/C]TC	DEKFA(A / D)QDD	8.2/17.5		
NFE2L1	AA[T/C]AC	NELLSK(H/Y)QL	0.8/0.95		
TES	CT[A/C]TG	AERAG(S/Y)DKL	2.25/1.9	HLA-B*4403	
ANKFY1	TC[A/T]GT	E(Q/L)MKLANRF	1.15/2.8		
PLCH1	CC[T/A]TT	(M/K)MNNVTTDY	1.3/3.2		
EIF2AK3	CA[T/A]TA	DEFDKCLS(I/N)	1.3/3.75		
EPB41L2	GT[C/A]CT	EELDKAQE(Y/D)	0.15/2.1		
CSNK2A2	AC[C/A]GG	(L/R)FYMYELLK	1.75/1.8		
ZNF845	CA[G/T]CC	TFGRNS(S/A)LI	0.75/0.4	HLA-C*0401	
SLCO1B3	AA[G/T]GG	FFG(M/R)VYLGL	1.45/1.45		

Ainsi, l'utilisation d'un algorithme de prédiction à partir de 26 protéines mutées a permis d'identifier 26 néoépitopes candidats présentés par un des CMH-I (Tableau 1) testés.



Figure 29 : La représentation des scores de liaison prédits pour les peptides mutés et WT au CMH-I.

La capacité de fixation prédite au CMH-I a pu être comparée entre le peptide muté identifié précédemment (Tableau 1) et le peptide WT correspondant (Fig. 29). Certains peptides présentent des scores de fixation faibles, correspondant à une bonne affinité prédite, que ce soit pour le peptide muté ou le peptide WT, qui est inférieur à un score de 3. Ce type de mutations pourrait conduire à la création de néoépitopes. D'autres semblent présenter une meilleure capacité de fixation au CMH-I lorsqu'ils sont mutés, par rapport aux WT. Ces peptides s'ils sont immunogènes, pourraient correspondre à des néoagrétopes.

Ces résultats suggèrent que le traitement à l'Oxaliplatine conduit à une augmentation de l'immunogénicité de la lignée HT29, notamment par une augmentation de la capacité de fixation prédite, des peptides mutés au CMH-I.

Discussion et Conclusion

L'analyse des séquençages des ARN de la lignée HT29 traitée ou non par Oxaliplatine a permis d'identifier des mutations somatiques non silencieuses, spécifiques de la lignée HT29-OxaR au nombre de 180. La lignée HT29 après traitement par Oxaliplatine présente alors des taux de substitutions augmentés pour les types T>C, C>T, C>A et T>A. L'étude de Silva retrouve elle aussi la présence d'un fort taux de mutations des guanines, visibles par les substitutions de type C>T (Silva et al., 2005).

Au niveau des séquences préférentiellement ciblées par les adduits d'Oxaliplatine, AG, GG ou en 5' de ces motifs, la lignée HT29 présente après traitement de faibles variations concernant la fréquence d'apparition de chaque substitution. En effet, les plus grandes augmentations ont été identifiées pour les mutations comprises dans les motifs GG et AG, avec

les substitutions G>A et G>T, alors que l'étude menée par l'équipe de Silva a pu démontrer que les mutations induites par Oxaliplatine les plus fréquentes dans le gène HPRT sont en 5' des motifs AG et GG (Silva et al., 2005). En revanche, les substitutions les plus fréquentes ayant lieu au sein des motifs spécifiques de l'Oxaliplatine, à savoir G>T ou G>A identifiés dans la lignée HT29, sont en concordance avec ceux identifiés par l'équipe de Silva. Ainsi, les résultats obtenus sont concordants du point de vue du type de substitutions ; seuls les motifs ciblés par l'Oxaliplatine semblent être différents. La différence des motifs identifiés comme cibles peut sans doute être due à l'étude des ARN totaux pour la lignée HT29, alors que cette même étude se concentre sur les mutations ayant lieu au sein du seul gène HPRT.

La signature mutationnelle de la lignée HT29 WT ou OxaR ne correspond pas aux signatures décrites par Alexandrov pour les cancers colorectaux que sont les signatures 1B, 6, 10 ou R3, qui présentent respectivement, une majorité de C>T entre 2 et 10%, de C>T en 6 et 10%, de C>A et C>T compris entre 2 et 5% dont deux substitutions dépassent 20% et enfin la signature R3 présente surtout des substitutions T>C qui peuvent dépasser les 5% (Alexandrov et al., 2013). Dans cette même étude une signature mutationnelle décrite pour un agent alkylant, le Témozolomide, a été identifiée et correspond à de forts taux de substitutions C>T pouvant dépasser 15% pour le motif TCC. Or, la signature mutationnelle identifiée pour la lignée HT29 traitée par Oxaliplatine ne correspond pas à la signature de l'agent alkylant décrite par Alexandrov. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées avec notamment l'utilisation d'une lignée HT29 ne représentant pas la majorité des échantillons de cancers colorectaux analysés par l'équipe d'Alexandrov. De plus, les agents alkylants sont des composés différents et réagissent de façon différente avec l'ADN. Le Témozolomide ajoute des groupements méthyls aux guanines de l'ADN alors que l'Oxaliplatine ajoute des groupements de platines. En revanche, la signature 5 identifiée par Alexandrov semble être assez similaire avec celle de la lignée HT29-OxaR, avec moins de 10% de substitutions T>G, entre 10 et 20% de substitutions C>A, T>A et C>G et environ 30% de T>C et C>T. Or cette signature décrite par Alexandrov est présentée avec un antécédent de tabagisme contribuant à des mutations surtout de type C>T et T>C (Alexandrov et al., 2013). Ainsi, la signature mutationnelle de l'Oxaliplatine, correspondant au même type de profil que la signature mutationnelle 5 décrite par l'équipe d'Alexandrov reflétant l'effet mutagène des agents de tabac, permet de mettre en lumière l'effet mutagène de l'Oxaliplatine.

La présentation des données issues des séquences spécifiques des agents alkylants, AG, GG ou en 5' de ces motifs, sous une forme de présentation inspirée de l'analyse d'Alexandrov, a permis de confirmer la présence de substitutions de guanines majoritairement dans les motifs AG et GG, en accord avec le profil de mutation de l'agent alkylant identifié et les motifs identifiés comme spécifiques de l'Oxaliplatine (Fichtinger-Schepman et al., 1985; Saris et al., 1996; Silva et al., 2005).

Les données de ce travail sont ainsi en partie concordantes avec les données de la littérature (Silva et al., 2005). Toutefois, les proportions des mutations spécifiques restent assez faibles. Ces données devraient être validées dans d'autres modèles d'études, comme les lignées par exemple Colo 205 ou Colo 320, ayant elles aussi reçu des traitements successifs d'Oxaliplatine.

Cette étude nous a aussi permis d'identifier 26 néoépitopes candidats prédits pour être présenter par les molécules du CMH-I exprimées par la lignée HT29. La moitié de ces peptides présente une substitution comprise dans les séquences majoritairement ciblées par l'Oxaliplatine, AG, GG ou en 5'AG ou GG, que ce soit sur le brin sens ou anti-sens. Les mutations semblent pour la moitié des peptides, entrainer l'apparition de néoagrétope, correspondant à des peptides mutés ayant un score de fixation prédit plus faible que le WT, correspondant à une capacité de liaison entre le peptide et le CMH plus forte. Il reste à vérifier l'existence de lymphocytes T spécifiques de ces complexes CMH/peptide dans le répertoire T humain. Trois donneurs sains ont déjà été testés (données non présentées) sans que nous soyons en mesure d'induire des réponses sécrétrices d'IFN- γ . Toutefois, l'étude doit être réalisée sur un nombre plus important de donneurs ayant un typage HLA identique à celui de la lignée HT29, avant de pouvoir conclure.

Ces résultats pourraient montrer que l'efficacité de l'Oxaliplatine est en partie due à sa capacité à augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales, par l'induction de mutations et de néoépitopes, reconnus par les cellules T.

Matériel et méthode

Lignée cellulaire

La lignée humaine de cancer colorectale HT29 a été obtenue de *l'American Type Culture Collection cell bank* (ATCC[®] HTB-38) et a été maintenue en culture dans un milieu DMEM (Lonza) avec 10% *heat inactivated endotoxin free fœtal calf serum* (FCS) (Invitrogen), et 1% de pénicilline et streptomycine, à 37°C, 5% CO2 dans une atmosphère humide.

L'établissement de la résistance à l'Oxaliplatine (Sanofi) a été réalisé par des expositions à des concentrations croissantes de cet agent. La concentration initiale d'Oxaliplatine était de 1μ g/mL et toutes les deux semaines, les cellules ont été repiquées avec une concentration d'Oxaliplatine augmentée de 0.2μ g/mL. Finalement, les cellules survivantes

aux plus fortes concentrations d'Oxaliplatine ont été nommées HT29-OxaR. La concentration finale d'Oxaliplatine tolérée par la lignée est 3µg/mL et était utilisée pour la culture de la lignée HT29-OxaR.

Analyse RNA sequencing

L'ARN total des deux lignées WT ou OxaR a été extrait avec une pureté >98%, en utilisant *RNeasy mini-kit* (Qiagen). Cent nanogrammes d'ARN total ont été utilisé pour réaliser un reverse-transcription pour la synthèse d'ADNc biotinylés en utilisant l'*Illumina*[®] *TotalPrepTM RNA amplification kit* (Life technologies) en accord avec les instructions. Les signaux de fluorescence ont été collectés par le *HiScan device* (Illumina) utilisant l'*Illumina collection software*. Les données ont d'abord été analysées par *GenomeStudio data analysis Software* (Illumina). Pour cette étape, un essai d'hybridation control a été réalisé et a permis de valider toutes les procédures de l'expérience.

Identifications des mutations spécifiques de HT29WT et HT29-OxaR et des néoépitopes spécifiques de HT29-OxaR.

Les résultats de séquençage d'ARN de la lignée HT29WT et HT29-OxaR ont été comparés au génome de référence Hg19 pour identifier des mutations somatiques spécifiques de chaque lignée. Les mutations de la lignée HT29WT ont été éliminées des mutations dites spécifiques de HT29-OxaR. Des filtres ont été imposés afin de retrouver la copie WT de la séquence d'ARN dans la lignée HT29WT dans au minimum 10 reads. La version mutée est absente de la ligné HT29WT alors qu'elle est retrouvée dans au moins 10 reads dans la lignée HT29-OxaR. Ces SNP ainsi sélectionnées ont permis d'étudier le profil de mutation de la lignée HT29WT et HT29-OxaR. Afin d'identifier les mutations présentes dans une séquence codante pour une protéine, le logiciel IGV a été utilisé et a permis de sélectionner 26 protéines. Les séquences protéiques contenant la SNP ont été utilisées pour générer une liste de néoépitopes prédits pour fixer le CMH-I d'intérêt, en utilisant un algorithme de prédiction (Imuneépitope).

Analyse des mutations

Les profils de mutations ont été générés à partir des 304 SNP de la lignée HT29WT et des 180 SNP de la lignée HT29-OxaR en analysant les proportions des différentes substitutions de bases possibles ; C>A, G>T, C>G, G>C, C>T, G>A, T>A, A>T, T>C, A>G, T>G et A>C. Ensuite, les proportions de chaque substitution ont été analysées dans les motifs spécifiques d'alkylation AG, GG, ou en 5' de AG ou de GG. Les données ont ensuite été analysées de la même façon qu'Alexandrov (Alexandrov 2013). Enfin toutes les mutations des Guanines ont été étudiées.

Identification des peptides candidats
Les séquences protéiques sélectionnées ont été utilisées pour prédire une liste de peptides capables de fixer le CMH-I, soit HLA-A*0101, HLA-B*3501, *4403 ou HLA-C*0401. Les peptides ayant un score de fixation inférieur ou égal à 10 ont été sélectionnés et comparés au peptide WT correspondant.

Discussion et Conclusion

L'implication du système immunitaire dans l'élimination des cellules tumorales conduit progressivement à sculpter la tumeur qui échappe alors à l'immunosurveillance. La clé de la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires T est la présence d'antigènes de tumeurs qui permettent de discriminer les cellules tumorales des cellules saines. Les chimiothérapies initialement connues pour avoir un effet délétère sur le système immunitaire peuvent moduler de façon positive les réponses T antitumorales. En effet, certaines vont moduler le microenvironnement tumoral en passant par exemple par l'inhibition des cellules immunosuppressives, comme le Sorafenib (Cabrera et al., 2013; Cao et al., 2011; Desar et al., 2011). D'autres chimiothérapies vont pouvoir augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales en induisant par exemple des mutations, comme l'Oxaliplatine (Chaney et al., 2005; Silva et al., 2005), pouvant conduire à la formation de néoépitopes.

Les néoantigènes, issus entre autres de mutations somatiques ponctuelles non silencieuses, sont spécifiques des cellules tumorales. Le terme néoépitope regroupe deux types de « nouveaux » peptides. Certaines modifications n'améliorent pas la capacité de fixation de ce néopeptide au CMH, en revanche le TCR sera potentiellement plus à même de le reconnaitre. D'autres modifications permettent aux néoagrétopes d'être présentés par les molécules de CMH par l'augmentation de l'affinité du néopeptide pour les HLA par rapport au peptide WT. La grande diversité du répertoire des lymphocytes T, qui atteint un maximum théorique de 10^{15} TCR_{αβ} différents, permet de reconnaitre une grande variété d'épitopes, notamment des néoépitopes qui augmentent l'immunogénicité des cellules tumorales.

Plusieurs études ont pu démontrer l'importance des mutations dans l'élimination des cellules tumorales (Matsushita et al., 2016; Tran et al., 2014). Matsushita et son équipe ont pu mettre en évidence dans un modèle murin que l'immunogénicité des tumeurs non immunoéditées pouvait être due à l'expression de protéines mutées fortement immunogènes. Cette spécificité tumorale des néoantigènes, qui ne participent alors pas à la tolérance centrale, conduit à la présence des lymphocytes T pouvant exprimer un TCR très affin pour les néoépitopes. De ce fait, la présence d'un seul néoantigène au sein des cellules tumorales peut suffire à l'élimination de la tumeur, que ce soit de façon spontanée dans un modèle murin non édité (Matsushita et al., 2012) ou induite. Des réponses T spécifiques de néoantigènes et préexistantes avant traitement ont pu être mises en évidence chez des patients, par la présence de T spécifiques circulants en périphérie (Khodadoust et al., 2017; Schumacher et al., 2014) et infiltrants la tumeur (Cohen et al., 2015). L'apparition de réponses T spécifiques des néoantigènes des néoantigènes a aussi été décrite après traitement (Sahin et al., 2017; Tran et al., 2014). En effet, des vaccins personnalisés utilisant des néoépitopes ont récemment permis à des patients atteints

de mélanome une régression complète de leur tumeur, avec ou sans traitement complémentaire par un anti-PD-1 (Ott et al., 2017). Des vaccins ciblant le récepteur variant III de l'EGF ont permis d'augmenter la survie sans progression de patients atteints de glioblastome (Sampson et al., 2010). D'autres traitements ont été utilisés et ont permis une régression tumorale, comme le transfert adoptif des TIL spécifiques de la protéine mutée ERBB2IP (Tran et al., 2014).

L'étude des mutations présentes chez un individu pourrait nécessiter d'observer aussi leur répartition au sein des différentes tumeurs, mais aussi de plusieurs régions d'une même masse tumorale. En effet, l'évolution du cancer au point de vue de son hétérogénéité intratumorale (ITH) est dépendante du type de cancer et de son histoire (Gerlinger et al., 2012). De façon générale, les mutations sont plutôt considérées comme favorables pour l'immunité antitumorale. Cependant, certaines études notamment réalisées par Laudau et al. démontrent l'importance de la clonalité de ces mutations pour une réponse immunitaire efficace conduisant à l'élimination des tumeurs (Landau et al., 2013). Les mutations sous-clonales, même dans des gènes *drivers*, dans la LLC seraient associées à un mauvais pronostic pour les patients (Landau et al., 2013). En effet, tous les néoépitopes même immunogènes ne se valent pas quant à leur efficacité pour éliminer l'ensemble des cellules tumorales. Les lymphocytes T spécifiques de néoépitopes sous-clonaux seront en mesure de reconnaitre et d'éliminer une partie des cellules tumorales, contrairement aux lymphocytes T spécifiques des néoantigènes clonaux qui semblent être en mesure d'éliminer l'ensemble des tumeurs d'un individu (McGranahan et al., 2016).

Une autre caractéristique à prendre en compte pour l'étude des mutations dans les cellules cancéreuses est le taux global de mutations au sein d'une tumeur, qui est variable selon le type de cancer (Alexandrov et al., 2013). Les équipes de Rizvi et Snyder ont étudié l'impact de cette charge mutationnelle sur l'efficacité de certaines immunothérapies, notamment anti PD-1 dans le cancer du poumon et anti-CTLA-4 dans le mélanome. Ainsi, une forte charge mutationnelle tumorale est associée à une augmentation des bénéfices cliniques à long terme et à de meilleures survies sans progression, après traitement par des inhibiteurs des *immune checkpoints* ciblant PD-1 ou CTLA-4 (Rizvi et al., 2015; Snyder et al., 2014). L'étude de la charge mutationnelle des tumeurs a pu révéler que le nombre total de mutations seul n'est pas associé à la survie des patients, en revanche, le nombre de néoépitopes prédits comme immunogènes est lui corrélé à une meilleure survie (Brown et al., 2014). Ainsi, l'étude de l'immunogénicité des tumeurs implique, entre autre, l'étude de l'immunogénicité des mutations apparues avant, pendant ou après traitement des cellules cancéreuses.

Ce travail de thèse a été consacré à l'étude de réponses immunitaires T dirigées contre des néoantigènes, apparus avant ou après traitements par des agents antitumoraux.

L'identification de néoantigènes immunogènes, ou potentiellement immunogènes, a pu être réalisée dans deux études différentes, en utilisant une stratégie d'immunologie inverse. En effet, concernant la première partie des travaux, l'identification de néoépitopes in silico a été réalisée et s'est poursuivie sur l'étude de leur immunogénicité, réalisée in vitro à partir de PBMC d'un patient en rémission complète d'un CHC avancé après traitement par Sorafenib. Ainsi les réponses mémoires antitumorales dirigées contre des néoantigènes ont pu être étudiées. Pour la seconde partie, la potentielle induction de mutations immunogènes par un agent alkylant, l'Oxaliplatine, sur une lignée cellulaire HT29 a été étudiée. Tout d'abord, l'identification d'une signature mutationnelle de l'Oxaliplatine dans cette lignée a été confirmée, puis l'étude s'est poursuivie par l'identification de néoépitopes, potentiellement immunogènes, prédits pour être présentés par les molécules CMH-I. Identification de néoantigènes immunogènes spécifiques d'un hépatocarcinome cellulaire avancé en rémission complète après traitement par Sorafenib

Cette première étude est réalisée dans un contexte rétrospectif. En effet, le patient diagnostiqué pour un CHC avancé est en réponse complète depuis déjà plusieurs années au moment de l'étude de ses réponses immunitaires. Les CHC font partie des cancers les plus mortels. Le diagnostic se fait dans la plupart des cas au stade métastatique. Seulement 20% d'entre eux peuvent bénéficier d'une thérapie curative, passant notamment par une chirurgie ou une greffe hépatique et donc 80% des patients reçoivent du Sorafenib, le traitement de référence.

Le Sorafenib est un agent anti-angiogénique et cytostatique. Cette molécule n'a pas de cible précise, mais va pouvoir inhiber plusieurs kinases au sein des cellules. Initialement, le Sorafenib a été développé pour inhiber Raf-1, mais il s'est avéré qu'il peut aussi inhiber BRAF WT, ou BRAF^{v600}, les récepteurs VEGFR-2 et -3, PDGFR, Flt3, c-Kit. Plus récemment, la kinase BCR-Abl a été identifiée comme une nouvelle cible du Sorafenib (Kurosu et al., 2009). Ainsi, cet inhibiteur de multiples kinases peut inhiber la voie des MAP kinases, mais aussi la voie STAT-3. Cette dernière est inhibée par l'activation de la phosphatase SHP-1 qui inactive par déphosphorylation STAT-3. Cette voie est normalement inactive dans les cellules saines, mais activée de façon constitutive dans 60% des CHC, suite à une inflammation locale, un stress oxydatif ou la sécrétion de facteurs de croissance (He and Karin, 2011). Le facteur de transcription STAT-3 permet, lorsqu'il est phosphorylé, d'activer la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse, la prolifération et la survie des cellules, comme la cycline D1, la survivine ou Mcl-1. Ces évènements conduisent à une diminution d'expression des protéines anti-apoptotiques de façon indépendante de la voie des MAP kinases (Rahmani et al., 2005; Yu et al., 2005). Ils conduisent aussi à une inhibition de la phosphorylation du facteur eIF4E, qui est alors inactivée et incapable d'activer l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ainsi le Sorafenib permet d'augmenter la sensibilisation à l'apoptose des cellules, d'inhiber la croissance tumorale, mais aussi la néoangiogenèse par l'inhibition de la voie VEGF/VEGFR.

Malgré les divers effets du sorafenib, la survie globale de ces patients est prolongée de 2,7 mois en moyenne (Rimassa and Santoro, 2009) avec seulement 0,6% des patients en

rémission complète (Shiba et al., 2014). Le faible taux de réponse au traitement est sans doute lié au contexte immunologique de ces cancers. En effet, les CHC sont un mélange complexe de réponses immunitaires et de cellules immunosuppressives (Cao et al., 2011; Fu et al., 2007; Hoechst et al., 2008; Lugade et al., 2013; Unitt et al., 2005). Parmi ces cellules immunosuppressives, les Treg et les MDSC sont connues pour être impliquées dans le développement de ces cancers en inhibant les réponses antitumorales. Ce lien se traduit par l'existence d'une corrélation positive entre le nombre de ces cellules immunosuppressives et la masse tumorale (Unitt et al., 2005; Cao et al., 2007). Or, les Treg et les MDSC sont connus pour exprimer fortement certaines cibles du Sorafenib (c-kit, Flt3) (Klein et al., 2013), expliquant en partie le rôle immunomodulateur de cet agent. Il est suggéré, dans le modèle de CHC murin, que le Sorafenib pourrait alors conduire à une augmentation de l'immunité antitumorale, en diminuant les populations immunosuppressives, allant jusqu'à la suppression de la progression tumorale (Cao et al., 2011). Ces effets immunomodulateurs ont été confirmés dans des CHC de patients pour lesquels le Sorafenib a induit une augmentation des fonctions des cellules T effecteurs une diminution du nombre de CD4⁺ et CD8⁺ PD-1⁺ circulants et par la diminution du nombre de Treg FoxP3⁺ (Kalathil et al., 2016; Lugade et al., 2013). Tous ces évènements sont liés à une amélioration de la survie globale de ces patients (Kalathil et al., 2016). Cette diminution d'expression de PD-1 par les cellules T effectrices (CD4⁺ et CD8⁺) spécifiques d'un antigène de tumeur passerait par l'inhibition de la voie VEGF-VEGFR (Kalathil et al., 2016; Voron et al., 2014). L'étude réalisée par Kalathil et al. suggère que l'immunité T antitumorale pourrait être préexistante chez les patients atteints d'un CHC, mais inhibée par l'expression de PD-1 sur les cellules T (Kalathil et al., 2016).

L'immunogénicité d'un CHC due aux néoantigènes identifiés après une rémission

complète

Ainsi, par ces différentes actions immunomodulatrices associées à l'effet antiprolifératif et antiangiogénique du sorafenib, ce traitement permet de moduler le microenvironnement tumorale le rendant alors permissif aux réponses immunitaires T antitumorales en partie préexistantes. Les réponses immunitaires étudiées chez ce patient correspondent aux réponses spécifiques de mutations ponctuelles non-silencieuses, préexistantes au sein de ses cellules tumorales lors du diagnostic et donc avant traitement. Au vu du nombre de mutations somatiques identifiées, cet hépatocarcinome n'était pas un cancer hypermuté qui excède en moyenne 10 000 mutations (Roberts and Gordenin, 2014). Les 20 néoépitopes, identifiés *in*

silico par des algorithmes de prédiction pour être présentés par le HLA-DRB1*1501 à partir de séquençages d'exomes de cellules saines et de cellules tumorales du patient, sont certainement issus de mutations liées à l'instabilité génique caractéristique des cellules cancéreuses. En effet, aucune correspondance n'a pu être établie avec les signatures mutationnelles décrites par Alexandrov correspondant aux mutations retrouvées dans les cancers du foie (Alexandrov et al., 2013). La stratégie d'étude utilisée ici s'est révélée efficace puisque les différents critères de sélection établis, concernant les mutations d'intérêts mais aussi les peptides candidats, ont permis de restreindre le nombre de neopeptides à tester *in vitro* à 20. Ainsi, à partir de ces néopeptides candidats, 15% d'entre eux se sont révélés être immunogènes. Plusieurs études ont révélées que le système de prédiction, notamment pour la fixation au CMH-II, devait être amélioré puisque seulement 0,5% des néopeptides prédits sont réellement immunogènes (Linnemann et al., 2015).

L'oncogénicité des néoantigènes immunogènes

La présence de néoantigènes immunogènes spécifiques des cellules tumorales a pu être mise en évidence. Ces néoantigènes correspondent aux protéines mutées HELZ2^{V241M}, IL1- β^{S230F} et MLL2^{A4802S}. La fonction cellulaire de ces trois protéines est connue et peut les impliquer dans l'oncogenèse. Tout d'abord, la protéine HELZ2 est impliquée dans l'activation du peroxysome et pourrait stimuler la prolifération des cellules tumorales, en passant par la voie PPAR- α . L'IL-1- β a un rôle important dans l'inflammation et permet l'activation de la voie des MAP-Kinases. Cette cytokine est un probable biomarqueur de progression des CHC du stade III au stade IV (Li et al., 2016). Enfin, MLL2 est une histone méthyl-transférase, décrite pour être une protéine driver dans de nombreux cancers (Parsons et al., 2011; Stephens et al., 2012; Yin et al., 2014). Une instabilité génique a été observée dans une lignée murine lorsque le gène codant la protéine MLL2 est absent, reflétant ainsi l'importance de cette protéine dans le maintien de la stabilité du génome cellulaire (Kantidakis et al., 2016). De plus, MLL peut être présente sous quatre isoformes dont MLL2 et est connue pour être mutée dans 50% des CHC (Fujimoto et al., 2012). En revanche, la substitution pour chacune de ces trois protéines n'avant jamais été identifiée ou répertoriée dans COSMIC renforce l'idée du caractère privé de ces néoépitopes. De plus, cela signifie que l'impact de ces mutations sur la fonctionnalité des protéines est inconnu, de même que le rôle de ces néoantigènes dans l'oncogenèse. Cependant, l'acide aminé ciblé par chacune de ces mutations n'est pas situé dans une partie liée à l'activité catalytique ou de fixation à l'ADN, pour ces trois protéines. HELZ2, IL1-β et MLL2, connues

pour être mutées dans plusieurs cancers, n'avaient encore pas conduit à l'identification de néoépitopes immunogènes.

L'immunité antitumorale spécifique de néoantigènes associés aux CHC

L'élimination de cellules tumorales de ce patient en réponse complète d'un CHC avancé dix mois après traitement par Sorafenib, peut être en partie due aux néoépitopes immunogènes identifiés à partir des néoantigènes HELZ2^{V241M}, IL1-β^{S230F} et MLL2^{A4802S}. Toutefois, nous n'avons aucune certitude quant à la seule implication de ces néoépitopes dans l'élimination des cellules tumorales. Des réponses immunitaires dirigées contre d'autres antigènes de tumeurs ont sans doute pu être efficaces. Effectivement, plusieurs antigènes de tumeurs sont fréquemment retrouvés dans les CHC, tels que Mage-3 et -1 dans 46 à 80% des cas, NY-ESO1 dans 13 à 51% des cas et généralement au stade précoce, la protéine associée à une résistance multi-drogue 3 (MRP-3), l'alpha-foetoprotéine (AFP), Glypican-3 ou encore Htert (Sun et al., 2016). Certaines immunothérapies ont été testées dans les CHC, notamment des vaccins dirigés contre quelques-uns de ces antigènes, notamment MRP-3, l'AFP ou Glypican-3, mais n'ont pas donné de résultats améliorant la survie globale des patients. Cependant, ces essais ont été parfois réalisés avec un nombre très faible de patients (Sawada et al., 2012; Shen et al., 2013). En dehors du type d'antigènes étudié, la démarche d'identification des néoantigènes utilisée dans ce travail correspond à une identification personnalisée d'une partie seulement des néoépitopes. En effet, cette étude correspond uniquement à la recherche de néoépitopes issus de mutations ponctuelles non silencieuses. Or d'autres néoépitopes pourraient être étudiés, comme les modifications du cadre ouvert de lecture ou frameshift, les insertions/délétions ou les modifications post-traductionnelles, comme des épitopes issus de protéines hyperméthylées.

La répartition et l'expression des néoantigènes

Beaucoup d'études associent un séquençage d'exome à un séquençage d'ARN pour l'identification de néoantigènes (de Bruin et al., 2014). En effet, le séquençage d'ARN des cellules tumorales permettrait de confirmer la transcription de ces gènes mutés correspondants aux néoépitopes, au sein des cellules tumorales. Toutefois, la présence des réponses mémoires dirigées contre ces trois néoépitopes reflète indirectement la présence des protéines mutées, permettant alors de s'affranchir d'un séquençage d'ARN.

La répartition des néoantigènes au sein des cellules tumorales semble jouer un rôle important dans l'élimination des tumeurs et serait associée au moment d'apparition de la mutation dans l'histoire du cancer (Murugaesu et al., 2015). Or, les échantillons utilisés pour le séquençage de l'exome correspondent aux cellules tumorales prélevées lors de la biopsie de la tumeur. Le moment d'apparition de ces néoantigènes est inconnu, ainsi que leur distribution au sein de l'ensemble des cellules tumorales, primaires et métastatiques. Il est alors impossible de déterminer leur clonalité ou sous-clonalité. Néanmoins, il semblerait que ces néoantigènes aient bien été exprimés par les cellules tumorales lors du traitement par Sorafenib, puisqu'ils ont été identifiés quelques semaines auparavant, lors du diagnostic. L'analyse par séquençage d'exome ou d'ARN des différentes tumeurs du patient, ou régions d'une même tumeur, pourrait révéler la distribution de ces mutations et permettrait de connaitre leur histoire dans l'évolution du cancer chez ce patient. Néanmoins, la quantité du matériel biologique à notre disposition, ainsi que sa qualité, limite le type d'analyse possible, contraignant à la réalisation d'un séquençage d'exome seul. Cependant, concernant la réelle existance de ces séquences en acides aminés mutées identifiées par le séquençage d'exome, notre stratégie d'étude permet de confirmer leur présence puisque l'identification de T mémoires spécifiques a pu être observée. Les réponses immunitaires T de type Th1, connues pour être de bon pronostic pour les patients (Fridman et al., 2012), sont toujours présentes 5 ans après l'élimination des cellules tumorales et parmi les cellules circulantes de ce patient, ce qui reflète le caractère potentiellement dominant de ces néopeptides.

Les clones T CD4+ spécifiques des néoépitopes

Toutefois, notre stratégie était basée sur l'identification d'épitopes restreints par le HLA-DRB1*1501, alors que le clone T que nous avons pu isoler reconnait un néoépitope présenté par le HLA-DPB1*04. Les différentes expériences de clonage réalisées ont conduit à isoler ce même clonotype. Il est donc impossible de savoir si d'autres clones restreints par le HLA-DRB1*1501 sont présents dans le sang de ce patient. La durée de la culture *in vitro* des PBMC pourrait en partie expliquer cette absence d'identification de clonotypes différents, spécifiques du peptide muté 49 à l'issue des étapes de sélection, de clonage et d'amplification (Cohen et al., 2015). Ces conditions de culture pourraient aussi expliquer la perte des T spécifiques des deux autres néopeptides issus des protéines mutées IL-1 β et MLL2 (Ott et al., 2017).

L'étude de néopeptides présentés par le CMH de classe I issus d'un CHC avancé en

rémission complète

L'étude des néoantigènes présentés par le CMH-I, notamment par le HLA-A*0201 n'a pas permis d'identifier des néopeptides immunogènes, malgré la présence d'un pool de néopeptides induisant la sécrétion d'IFN- γ par les PBMC de ce patient (données non montrées). D'autres expériences seront réalisées afin d'identifier les mutations potentiellement immunogènes reconnues par les lymphocytes T CD8⁺. En effet, les réponses T spécifiques des néopeptides présentés par le CMH-II pourraient être associées à des réponses ciblant les néoantigènes présentés par le CMH-I. Cependant, la plupart des réponses Spécifiques de néoépitopes, identifiées dans un modèle murin, sont des réponses T CD4⁺ soulignant l'importance de leur rôle dans la coordination des réponses immunitaires (Kreiter et al., 2015).

Les inhibiteurs des immunecheckpoints dans les CHC

La présence de réponses immunitaires spécifiques de néoantigènes ne semblerait pas permettre à elle seule l'élimination des cellules tumorales, avant traitement par Sorafenib. Par ces effets immunomodulateurs, le Sorafenib aurait pu permettre de libérer l'action antitumorale des réponses immunitaires T potentiellement inhibées par l'axe PD-1/PD-L1. Cette identification de réponses mémoires dirigées contre des néoantigènes après traitement et rémission du patient est un argument en faveur de l'utilisation du Sorafenib, non plus en monothérapie, mais en association avec une immunothérapie ciblant des inhibiteurs des checkpoints, comme un anti-PD-1. L'utilisation du Nivolumab (anti-PD-1) est en voie d'être approuvée par la FDA pour son utilisation dans le CHC en monothérapie (Kudo, 2017), reflétant ainsi l'importance de l'axe PD-1/PD-L1 dans l'inhibition des réponses immunitaires spécifiques de la tumeur dans les CHC. L'expression membranaire de PD-L1 en surface des cellules tumorales a été détectée dans 19 à 82% des CHC suivant les études (Huang et al., 2017; Khemlina et al., 2017). De façon intéressante, le taux de réponse au traitement par Nivolumab pour des CHC est d'environ 19%, incluant 5% de remissions complète (El-Khoueiry et al., 2016; Khemlina et al., 2017). Toutefois, il semblerait que l'expression de PD-L1, malgré son lien avec les réponses T dans les CHC, n'est pas un marqueur pronostique pour ces patients (Huang et al., 2017).

Une étude récente de Zhou et al. a démontré que les T spécifiques de TAA dans les CHC exprimaient fortement les inhibiteurs PD-1, TIM-3 et LAG-3, comparés aux lymphocytes T

provenant du foie sain ou circulant en périphérie (Zhou et al., 2017). De plus, il a aussi été démontré dans cette même étude que les anticorps spécifiques de PD-L1, TIM-3 ou de LAG-3 permettaient de restaurer les réponses T spécifiques des antigènes de CHC, avec un effet addictif lorsqu'ils sont combinés.

La clonalité des néoantigènes et les réponses immunitaires les ciblant

En plus de son effet direct sur l'axe PD-1/PD-L1 et la restauration des réponses spécifiques des TAA dans les CHC, il a été démontré que l'anticorps anti-PD-1 pouvait entrainer un phénomène de diversification des antigènes reconnus par les lymphocytes T (Memarnejadian et al., 2017). Ce phénomène, appelé epitope spreading, est induit par l'activation de réponses T subdominantes. Or, Komatopoulos et son équipe ont démontré dès 1992 que dans un contexte d'autoimmunité, les lymphocytes T persistant en périphérie sont spécifiques de peptide sousdominant, ce qui suggère que la tolérance du soi serait limitée aux peptides dominant du soi (Cibotti et al., 1992). Cette étude suggère un rôle alors important des lymphocytes spécifiques des antigènes sous-dominants dans l'autoimmunité (Cibotti et al., 1992). La sélection immunologique a lieu très tôt lors du développement des tumeurs, éliminant alors les cellules tumorales exprimant les antigènes clonaux les plus immunogènes. Les antigènes mutés persistant ne sont alors pas les plus immunogènes sauf si les mécanismes d'échappement se mettent en place avant l'émergence de la mutation pouvant alors conduire à la création d'un néoantigène clonal potentiellement très immunogène. Une récente étude a pu mettre en évidence que les néoantigènes clonaux avaient moins d'affinité pour les HLA des patients. Ces néoantigènes clonaux auraient alors moins de chance d'être présentés par le CMH des patients et donc d'être reconnus par les lymphocytes T du patient (Marty et al., 2017). Les antigènes non-clonaux ne sont peut-être pas moins efficaces dans l'élimination des tumeurs mais seulement moins souvent identifiés. En effet, la proportion de T spécifiques d'antigènes de tumeurs non clonaux serait bien moins importante que celle des T spécifiques d'antigènes clonaux, rendant leur identification plus difficile et moins régulière (McGranahan et al., 2016).

L'apparition de nouvelles mutations au sein des cellules tumorales peut entrainer la création de néoépitopes présentés par les cellules tumorales et reconnus par les lymphocytes T. Ce renouvellement du répertoire T permettrait d'éviter l'épuisement de tous les T spécifiques des tumeurs. Certains résultats vont dans ce sens, notamment ceux de l'équipe de Tang qui démontrent que l'effet d'une immunothérapie ciblant PD-L1 passerait par l'arrivée de T au sein

du microenvironnement tumoral (Tang et al., 2016). Ainsi, les effets antitumoraux de cet inhibiteur d'*immunecheckpoint* seraient complétement abrogés lorsque l'infiltration tumorale par les T est bloquée.

Le Sorafenib permettrait alors de ralentir ou stopper la progression tumorale et un anti PD-1 par exemple, permettrait d'une part d'avoir une plus grande variété d'épitopes présentés par les cellules tumorales, mais aussi d'augmenter les réponses immunitaires spécifiques des CHC en modulant le microenvironnement tumoral. Les néoantigènes immunogènes semblent jouer un rôle primordial dans les réponses immunitaires spécifiques des hépatocarcinomes. L'étude des néoépitopes immunogènes chez ce patient permet de confirmer l'existence de réponses T CD4+ de type Th1 ciblant des néoantigènes dans les CHC avancés. Ainsi, les réponses T CD4+ antitumorales, comprenant les réponses spécifiques de ces néoantiènes identifiés, ont sans doute pu être réactivées et devenir alors efficaces pour ce patient en rémission complète, après traitement par Sorafenib.

II) Étude de la présence d'une signature mutationnelle et de néoantigènes potentiellement immunogènes induits par Oxaliplatine

L'oxaliplatine est une chimiothérapie utilisée depuis les années 80, surtout dans le cancer colorectal et du pancréas. L'oxaliplatine, comme plusieurs agents anticancéreux, peut agir à différent niveaux avec tout d'abord un effet cytotoxique direct sur les cellules cancéreuses. Cette molécule pénètre la cellule pour y être hydrolysée et forme alors des composés très électrophiles et affins pour les nucléophiles cellulaires comme l'ADN. Ces agents vont alors créer des ponts inter- et intra brins d'ADN par l'ajout d'adduits de platine, principalement sur les azotes en position 7 des bases Guanine. Ces adduits vont modifier la courbure de l'ADN. Ces modifications vont alors interférer avec les mécanismes de réplication et de transcription de l'ADN et peuvent conduire à l'apoptose de la cellule (Bose et al., 2008).

D'autres effets plutôt indirects immunostimulants ont été décrits pour l'Oxaliplatine (Figure 30), passant par l'induction d'une apoptose immunogène avec l'exposition de la calréticuline en surface cellulaire (Panaretakis et al., 2009), la libération d'ATP et HMGB1 dans le milieu extracellulaire, mais aussi l'augmentation de la sensibilité à la lyse cellulaire induite par les cellules cytotoxiques (Obeid et al., 2007; Tesniere et al., 2010; Zitvogel et al., 2013). Cette mort immunogène est importante pour l'efficacité de l'Oxaliplatine chez les patients atteint d'un CRC (Tesniere et al., 2010). De plus, cet agent alkylant entraine l'augmentation de l'expression du CMH-I par les cellules tumorales, permettant leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺ (Liu et al., 2010). Les cellules tumorales vont aussi exprimer de façon plus importante les ligands des récepteurs activateurs de cellules NK, comme MIC-A, MIC-B et ULMPB-3 (Siew et al., 2015).

L'Oxaliplatine peut entrainer une modulation de l'antigénicité des cellules tumorales en modulant l'expression des TAA ou TSA présentés. Lorsqu'il est associé au 5-FluoroUracile (5-FU) et au Leucovorin, une augmentation d'expression membranaire de l'antigène CEA est observée dans les cancers colorectaux (Prete et al., 2008). L'Oxaliplatine est aussi connu pour induire l'autophagie dans les cellules qui tentent de survivre au traitement (Yang et al., 2015). Or ce mécanisme de survie est impliqué dans la présentation d'épitope par le CMH-II et est alors potentiellement impliqué dans une augmentation des réponses T CD4⁺ antitumorales (Münz, 2012). Enfin, les groupements alkyles ajoutés aux bases de l'ADN peuvent induire des

mutations majoritairement retrouvées dans des séquences particulières de l'ADN ; AG, GG ou en 5'AG ou 5'GG (Silva et al., 2005). Ces mutations, pouvant alors être partagées, pourraient induire la formation de néoépitopes potentiellement immunogènes.



Figure 30 : Des mécanismes d'action de l'Oxaliplatine

L'Oxaliplatine va ajouter des groupements alkyles sur les bases des acides nucléiques notamment, créant des ponts inter et intra brins d'ADN, inhibant alors la réplication de l'ADN et induisant la réparation de l'ADN qui pourra conduire à la création de mutation. Les mutations induites vont pouvoir conduire à la création de néoépitopes potentiellement reconnus par les lymphocytes T. L'Oxaliplatine peut aussi modifier la quantité d'épitopes présentés en surface pour un antigène. L'Oxaliplatine va aussi induire une apoptose immunogène, passant par une externalisation de la calréticuline en surface, une libération d'ATP et d'HMGB1 dans le milieu extra cellulaire, permettant le recrutement et la maturation de cellules dendritiques (**d'après Galluzzi et al., 2012; Starobova and Vetter, 2017**).

Ainsi, l'Oxaliplatine va ralentir la croissance tumorale et induire l'apoptose des cellules tumorales, de façon directe ou par l'intermédiaire des cellules immunitaires cytotoxiques. De plus, parmi ces effets indirects, l'Oxaliplatine va permettre le recrutement de cellules dendritiques, qui vont alors pouvoir s'activer et devenir matures tout en présentant divers antigènes de tumeurs (Panaretakis et al., 2009). L'oxaliplatine va aussi pouvoir augmenter l'antigénicité et donc de l'immunogénicité des cellules tumorales (Fig. 30). Ces réactions peuvent s'associer pour créer un microenvironnement tumoral favorable aux réponses immunitaires spécifiques des cellules cancéreuses, augmentant la capacité d'élimination des tumeurs.

Le profil des substitutions après de l'Oxaliplatine dans la lignée HT29

Cette étude a permis d'identifier une signature mutationnelle d'un traitement par un agent alkylant mutagène, l'Oxaliplatine, qui pourrait être à l'origine de néoépitopes potentiellement immunogènes.

Ainsi, la signature mutationnelle de l'oxaliplatine a tout d'abord pu être confirmée dans la lignée HT29-OxaR. La majorité des mutations a lieu sur les motifs AG ou GG et correspond majoritairement à des substitutions de type G>T ou G>A. Or une étude rapportait l'apparition de substitutions G>T ou G>A principalement sur les bases situées en 5' des motifs AG ou GG. L'étude réalisée par l'équipe de Silva et al. portait sur la seule séquence du gène HPRT, dans une lignée cellulaire traitée 1 ou 4h par Oxaliplatine. Ces différences par rapport à notre étude, ciblant l'ensemble des ARN de la lignée HT29 résistante au traitement d'intérêt, sont autant de facteurs pouvant expliquer la différence des motifs identifiés comme ciblés par l'agent alkylant (Silva et al., 2005).

L'étude du profil de mutation des cancers a permis d'identifier des signatures mutationnelles correspondant aux substitutions au sein de l'ADN. Par exemple, une signature présentant majoritairement des substitutions C>T est caractéristique d'agents mutagènes, comme les UV ou des composants du tabac. De plus, certains traitements connus pour induire des mutations présentent aussi une signature qui leur est propre, comme le Temozolomide (Alexandrov et al., 2013; Silva et al., 2005). La lignée HT29 après traitement par Oxaliplatine présente une signature mutationnelle assez proche de la signature 5 identifiée par Alexandrov et son équipe, correspondant à une signature d'agents mutagènes.

Lorsque les mutations sont étudiées à la façon d'Alexandrov, l'Oxaliplatine induit dans cette lignée un profil mutationnel avec le plus souvent des substitutions C>T ou T>C. Or cette signature ne correspond pas aux profils mutationnels des échantillons de cancers colorectaux testés par Alexandrov, ni à la signature de l'agent alkylant Témozolomide. Le Témozolomide est un agent méthylant de l'ADN, qui agit principalement sur les O en position 6 et N en position 7 des Guanines, alors que l'Oxaliplatine ajoute des adduits de platine. Or, même pour deux agents qui ajoutent des adduits de platine, le Cisplatine et l'Oxaliplatine, des propriétés différentes des adduits ont été identifiées, ne conduisant alors pas aux mêmes modifications au

niveau de l'ADN (Chaney et al., 2005). Les composés dérivés de ces agents alkylants une fois entrés dans les cellules sont variables selon l'agent alkylant et ne peuvent alors pas interagir de la même façon avec les nucléophiles avec lesquels ils établissent des liaisons. De plus, ces composés vont ajouter des groupements alkyls qualitativement et quantitativement différents (Raymond et al., 2002). La lignée HT29 est un adénocarcinome de colon et a été isolée en 1964 d'une tumeur primaire d'une patiente. Une sélection cellulaire s'est certainement produite, liée à la mise culture in vitro de HT29, ainsi qu'une dérive de la lignée qui ne représente plus la majorité des échantillons cliniques testés par Alexandrov, expliquant l'absence de correspondance avec les signatures mutationnelles des CRC.

Les mutations dans les CRC et le traitement par Oxaliplatine

Certains cancers peuvent être caractérisés de cancer hypermutés, avec une très forte charge mutationnelle (Roberts and Gordenin, 2014). La lignée HT29, au vue de son nombre de mutations, ne semble pas faire partie de ce type de cancers, de plus cette lignée de cancer colorectale est caractérisée par des séquences MicroSatellitaires Stables (MSS) (Ahmed et al., 2013). Les cancers MSS présentent un pronostique moins bon que les CRC MicroSatellitaire Instables (MSI) caractérisés par un système de réparation MMR défectueux (Merok et al., 2013). L'un des facteurs pronostics pour la survie des patients atteints d'un CRC identifié est le statut MRR (Zaanan et al., 2010). En effet, un dysfonctionnement du système MMR entraine l'apparition d'insertions et de délétions dans des séquences répétées et instables de l'ADN, appelées régions microsatellitaires instables. Une étude a alors comparé ces deux types de CRC pour des patients au stade II ou III et traités par une polychimiothérapie associant le 5-Fluorouracile (5-FU) à l'Oxaliplatine suivie de l'Acide Folinique, appelé FOLFOX. Or, 35% des CRC MSS sont en récidive contre seulement 10,5% des CRC MSI (Guetz et al., 2010). L'Oxaliplatine additionné au 5-FU permet donc d'améliorer la survie des patients. Malgré l'importance que semble avoir le statut MMR entre les CCR MSS et MSI pour le pronostic de ces patients, il a été démontré que l'action alkylante de l'Oxaliplatine est indépendante du système de réparation MMR (Raymond et al., 1998).

Les CRC MSI sont caractérisés par un taux de mutations très élevé, typiquement 10 à 50 fois plus élevé par rapport aux CRC MSS et vont alors présenter environ 20 fois plus de néoantigènes (Sun et al., 2016). La forte immunogénicité de certains néoépitopes peut conduire à de fortes réponses immunitaires antitumorales, permettant l'élimination des tumeurs. Les patients atteints d'un CRC MSI traités par FOLFOX ont en moyenne 3 ans de survie sans

rechute de plus que les patients traités par 5-FU seul (Zaanan et al., 2010). L'Oxaliplatine semble donc avoir un rôle primordial dans le contrôle de la pathologie, surtout lorsque la tumeur présente un fort potentiel immunogène caractérisé par de nombreuses mutations. En effet, cet agent alkylant est connu pour avoir de nombreux effets immunomodulateurs, comme l'induction d'une ICD ou encore la modulation de l'expression des antigènes de tumeurs. De plus, l'infiltrat tumoral des CRC MSI est riche en lymphocytes T CD8⁺, mais aussi en Th1 activés (Sun et al., 2016). Les effets de l'Oxaliplatine favorisant les réponses immunitaires antitumorales, associés à son effet mutagène, pourraient alors expliquer les bénéfices sur la survie des patients.

Les néoépitopes potentiellement immunogènes dans la lignée HT29 après traitement par Oxaliplatine

La seconde partie de ce travail a permis d'identifier de potentiels néoépitopes induit après ce traitement par Oxaliplatine. Les néoépitopes prédits pour être présentés par les molécules du CMH-I d'une lignée cellulaire de tumeur de côlon HT29 ont pu être identifiés selon différents critères de sélection, qui nous permettent de restreindre les nombre de peptides candidats. Cependant, ces filtres peuvent limiter les potentielles cibles néoantigéniques. Outre nos critères de sélection, il est établi que les algorithmes de sélection possèdent une capacité limitée pour l'identification des épitopes. En effet, environ 15% des épitopes cibles des lymphocytes T pourraient être ne pas être identifiés par ces algorithmes (Fritsch et al., 2014a). Finalement, à partir de 26 protéines mutées sélectionnées, 26 néoépitopes ont été identifiés, dont 10 prédits pour fixer le HLA-A*0101, 6 pour le HLA-B*3501, 9 pour le HLA-B*44 et 3 pour le HLA-C*0401.

L'effet mutagène de l'Oxaliplatine a été clairement identifié par les travaux de Silva et a pu être confirmé dans cette étude sur la lignée HT29. Identifier cette signature mutationnelle de l'Oxaliplatine dans d'autres lignées cellulaires permettrait de confirmer à nouveaux nos résultats et d'étendre la recherche des néoantigènes à d'autres lignées comme Colo-320, qui a aussi un statut MSS (Ahmed et al., 2013). En effet, si le ciblage de séquences particulières de l'ADN est établi dans plusieurs lignées, il existe alors de fortes chances pour que les mutations induites soient situées le plus souvent au niveau des mêmes gènes, et pourraient alors augmenter les chances d'induire des néoantigènes partagés. L'action mutagène de l'Oxaliplatine pourrait dans les CRC entrainer l'apparition de mutations somatiques non silencieuses, conduisant à la présentation de nouveaux néoépitopes potentiellement immunogènes à l'origine de nouvelles réponses immunitaires. Ainsi dans les MSS, ces réponses immunitaires antitumorales pourraient alors participer à l'élimination de la tumeur en créant ces réponses immunitaires spécifiques des néoantigènes, alors que dans les MSI les mutations induites par l'Oxaliplatine pourraient aider les réponses immunitaires tumorales déjà présentes. L'environnement favorable aux réponses antitumorales, ainsi que l'apparition de nouvelles cibles pour les lymphocytes T, permettrait d'augmenter les chances d'éliminer les cellules tumorales, tout en évitant l'épuisement des lymphocytes T.

Les immunothérapies dans les CRC

Les études réalisées par Rizvi et Snyder montrent une augmentation de l'efficacité des immunothérapies ciblant les *immune checkpoints* lorsque les tumeurs présentent une forte charge mutationnelle (Rizvi et al., 2015; Snyder et al., 2014). Ces études sont un atout en faveur d'une utilisation de ces traitements dans les CRC. En effet, les CRC MSI sont associés à une forte expression d'*immune checkpoint* (PD-1, PD-L1, CTLA-4), suggérant que la forte quantité de mutations dans les MSI favoriserait la création de néoantigènes immunogènes et donc de réponses immunitaires antitumorales, qui seraient alors inhibées par ces *immune checkpoints*. De plus, les équipes de Caroline Robert et Antoni Ribas ont pu démontrer que l'immunothérapie ciblant PD-1 pouvait induire une régression tumorale à condition qu'une réponse T CD8⁺ spécifique de la tumeur soit préexistante et négativement régulée par l'axe PD-1/PD-L1 (Tumeh et al., 2014). La présence de CD8⁺ dans l'infiltrat tumoral et la forte expression de PD-1/PD-L1 pour les CRC MSI correspondent donc aux deux caractéristiques qui semblent être essentielles pour une utilisation d'une immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1.

Finalement, les mutations induites dans les CRC pourraient induire des réponses immunitaires spécifiques d'épitopes, dont une partie serait des néoépitopes. Ces réponses T induites ne semblent cependant pas être toujours suffisantes seules puisqu'elles peuvent être inhibées notamment par les *immune checkpoints*, justifiant d'une éventuelle utilisation d'inhibiteur de ces *immune checkpoints*, ou de vaccins dirigés contre des néoépitopes préalablement identifiés. L'étude réalisée sur l'induction de ces mutations ponctuelles non silencieuses induites après traitement par Oxaliplatine, permettrait d'ajouter un effet immunomodulateur supplémentaire à l'Oxaliplatine, correspondant à la création de néoantigènes immunogènes et potentiellement partagés.

Ce travail de thèse a permis d'étudier l'apparition et l'impact des néoépitopes, issus de protéines mutées, dans l'immunité antitumorale. Lors du premier travail d'identification de néoépitopes immunogènes, le microenvironnement tumoral a semblé jouer un rôle majeur dans l'inactivation des réponses immunitaires antitumorales. En effet, cette première étude a permis l'identification de néoépitopes immunogènes spécifiques, chez un patient en rémission complète d'un CHC avancé après avoir reçu un traitement par Sorafenib. Dans le second sujet, les néoépitopes potentiellement immunogènes ont été identifiés suite à l'action d'un agent alkylant connu pour être mutagène, l'Oxaliplatine. Les deux traitements anticancéreux présentent des effets immunomodulateurs intervenant à différentes étapes de l'immunité antitumorale. En effet, le Sorafenib aurait besoin de réponses T spécifiques de tumeurs préexistantes avant traitement pour être efficace, alors que l'Oxaliplatine pourrait créer directement de nouvelles cibles et serait plutôt un soutien pour les lymphocytes T. Toutefois, il a été démontré que des réponses T antitumorales seraient aussi largement impliquées dans le pronostic des CRC. Les néoantigènes spécifiques des cellules tumorales et à l'origine de liaisons de fortes affinités avec les TCR des lymphocytes correspondent à des cibles particulièrement intéressantes dans le domaine de l'immunothérapie. En effet, que ce soit par l'utilisation d'anti-PD-1 ou d'anti-CTLA-4, les réponses T spécifiques des néoantigènes sont très importantes dans l'amélioration de l'efficacité de ces thérapies. Nos études suggèrent que les réponses immunitaires antitumorales semblent être toutes aussi importantes dans le cas de CHC traités par sorafenib ou potentiellement dans le cas de CRC traités par Oxaliplatine D'autres types d'immunothérapies peuvent aussi cibler les néoantigènes. En effet, certaines équipes explorent des nouvelles immunothérapies ciblant les néoantigènes pour lesquelles les résultats semblent prometteurs (Linnemann et al., 2015; Sahin et al., 2017; Ott et al., 2017). Ces immunothérapies sont initiées de façon plus ou moins personnalisée comme l'injection de lymphocytes T autologues activés et amplifiés in vitro, mais aussi par exemple la vaccination qui peut être réalisée à l'aide de DC chargées, de néopeptides ou même d'ARN codant des néopeptides.

La clonalité des néoantigènes et leur ciblage

L'équipe de Mc Granahan, dans une récente publication suggérant l'utilisation d'antigènes clonaux pour cibler l'ensemble des cellules tumorales (McGranahan et al., 2016), a identifié 98% de mutations sous-clonales après traitement par un agent alkylant, le dacarbazine qui est un triazène, une autre sous-classe d'agents alkylants. Cette étude explique une faible efficacité du Dacarbazine associé à un anti-CTLA-4 par la présence de ces nombreux neoépitopes sous-clonaux, alors en lien avec la présence de forte hétérogénéité intratumorale, potentiellement due à cet agent alkylant. Or l'étude de l'effet favorable ou non de l'induction de mutations par Dacarbazine n'est réalisée que sur trois patients (McGranahan et al., 2016). Il serait intéressant d'étudier l'impact de l'induction des mutations par des agents alkylants sur une cohorte de patients plus importante.

De plus, cette même étude de McGranahan et son équipe souligne l'importance de cibler les antigènes clonaux en immunothérapie antitumorale. Toutefois, plusieurs études ont pu démontrer que la stratégie visant à ne cibler qu'un seul antigène clonal lors d'une immunothérapie n'était pas toujours une bonne solution. En effet, une perte d'expression de l'antigène ciblé par le vaccin a déjà été observée et conduit alors à des rechutes (Sun et al., 2016). Il paraît alors indispensable de cibler différents antigènes ou de combiner plusieurs traitements pour potentialiser les effets antitumoraux et ainsi éviter à certains clones tumoraux, initialement minoritaires, d'émerger pour entrainer la création d'une nouvelle tumeur (McGranahan et al., 2016). D'autres études soulignent l'importance d'avoir de fort taux de mutations au sein des cellules cancéreuses pour augmenter l'efficacité de certains traitements ou même en tant que marqueur pronostique, comme pour les CRC MSI ou les cancers du poumon de patients tabagiques (Owonikoko et al., 2015). Une étude a pu déterminer que 95% des mutations présentes dans les cellules cancéreuses sont uniques et spécifiques d'un patient (Stratton, 2011). Or, les réponses immunitaires sous-clonales, même si elles ne permettent pas de cibler la totalité des cellules tumorales, vont permettent de créer un environnement plutôt favorable aux réponses immunitaires, donnant la possibilité aux lymphocytes T spécifiques inactivés par l'axe PD-1/PD-L1 d'être à nouveau activés. De plus, la création de nouveaux néoantigènes peuvent conduire à l'émergence de nouveaux néoépitopes suite à l'action mutagène de l'oxaliplatine. L'apparition de ces potentiels néoépitopes permettrait d'induire un renouvellement constant des épitopes présentés, pouvant alors activer de nouveaux lymphocytes T naïfs, n'ayant encore pu rencontrer leur cible néoantigénique. L'inhibition de

l'axe PD-1/PD-L1 est dépendante de l'arrivée de lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral. En effet, des tumeurs deviennent résistantes au traitement bloquant cette voie de signalisation inhibitrice des réponses T lorsque le recrutement de lymphocytes T dans le site tumoral est inhibé (Tang et al., 2016). Les expériences de vaccination contre des néoépitopes menées par Sahin et al. ont montré que les T spécifiques de néoépitopes induits par cette vaccination exprimaient PD-1 et les lésions induites conduisaient à la surexpression de PD-L1 (Sahin et al., 2017). La vaccination permettrait alors d'initier des réponses T efficaces mais inhibées par l'axe PD-1/PD-L1 (Sahin et al., 2017). Ces données conduisent alors à penser que ces réponses spécifiques des néoantigènes sont des réponses immunitaires efficaces pour l'élimination des cellules tumorales, mais qu'elles semblent cependant être inhibées, conduisant à la rechute de la pathologie pour ces patients. Ainsi, en plus de l'augmentation de la survie sans rechute des patients à haut risque après cette vaccination anti-néoépitopes, son association avec un traitement ciblant PD-1 a conduit à une rémission complète (Sahin et al., 2017). Les thérapies modulant l'environnement tumoral semblent indispensables à l'efficacité des réponses immunitaires ciblant les néoantigènes des cellules tumorales. La diminution de nombre de cellules T effecteurs PD-1+ permise par la plasticité d'expression de PD-1⁺ sur ces T effecteurs activés chez les patients atteint d'un CHC (Kalathil et al., 2016) après traitement par Sorafenib a permis l'efficacité des réponses T antitumorales. Ces réponses T spécifiques des néoépitopes ont certainement permis la réponse complète mais aussi cette rémission pour ce patient atteint d'une hépatocarcinome cellulaire avancé.

L'augmentation d'immunogénicité des cellules tumorales passe aussi par l'augmentation et la diversification des épitopes de tumeurs présentés par les molécules de CMH et reconnus par les lymphocytes T. Ainsi, les antigènes même sous-clonaux pourraient s'avérer être de véritables atouts pour une immunité adaptative antitumorale efficace. L'augmentation du nombre de mutations liée à l'augmentation du nombre de néoantigènes permet alors de neutraliser la sélection de variants par la perte de l'expression d'un antigène clonal pendant l'évolution de la tumeur ou suite à une immunothérapie ou de s'affranchir d'un ciblage d'antigènes clonaux ne pouvant être présentés avec une grande affinité par le CMH (Marty et al., 2017). L'étude de Matsushita a pu démontrer que l'immunoédition des tumeurs passait par l'élimination par un processus d'immunosélection cellulaire dépendant des lymphocytes T, via des antigènes forts, comme des néoantigènes (Matsushita et al., 2016).

Perspectives

Partant du fait que le cancer lorsqu'il est diagnostiqué a déjà mis en place un grand nombre de mécanismes permettant d'échapper à l'élimination par les cellules immunitaires. Ces tumeurs présentent souvent un environnement immunosuppressif qui contitue un grand défi pour le traitement de ces pathologies, puisque l'un des objectifs est de renverser ce microenvironnement, passant par l'apparition des signaux activateurs du le système immunitaire. L'immunosélection des antigènes réalisée lors de l'immunoédition éliminerait surtout les antigènes clonaux les plus immunogènes et pouvant se lier avec la plus forte affinité aux CMH (Marty et al., 2017). À l'issue de l'immunosélection il ne resterait alors que des antigènes peu immunogènes ou fixant les CMH avec une faible affinité ou potentiellement des antigènes sous-clonaux qui pourraient être plus immunogènes et avoir une forte affinité pour les CMH.

L'étude de l'effet potentiellement immunogène de l'Oxaliplatine passant par l'induction de néoépitopes pouvant être reconnus par les lymphocytes T, permet d'étudier ici l'action de ce traitement sur la création de nouvelles cibles du système immunitaire. Pour la première étude, les réponses immunitaires antitumorales étaient présentes avant le traitement, mais inactivées. Dans les deux cas, des mutations non silencieuses spécifiques des cellules tumorales ont permis l'identification de plusieurs néoépitopes, prédits pour être présentés par les molécules du CMH. Les résultats de ces algorithmes de prédiction restent hypothétiques, puisque 0,5% des peptides prédits pour fixer le CMH-II seraient immunogènes (Linnemann et al., 2015) et 55% des épitopes prédits pour fixer le CMH-I peuvent réellement être présentés (Rajasagi et al., 2014). Il est alors indispensable de vérifier leur immunogénicité, confirmant en même temps leur présentation par les CMH, avant de conclure sur leur potentiel rôle dans l'immunité anti tumorale. Or, si un peptide prédit in silico pour être présenté n'est pas immunogène, nous ne pouvons avec notre approche déterminer s'il n'est alors pas présenté par les molécules du CMH ou s'il n'est simplement pas reconnus par les TCR. Cette imprécision élimine la possibilité d'améliorer la fixation des peptides aux CMH, comme c'est le cas pour les peptides cryptiques (Duan et al., 2014). Par exemple, certains peptides peuvent voir leur stabilité augmentée, par la modification de l'acide aminé en position ou en C-Ter par des modifications de charges du peptide, lorsqu'il se fixe dans la poche du CMH-I. La stabilité conformationnelle de ces peptides peut être augmentée (Insaidoo et al., 2011; Sharma et al., 2001). En revanche, l'augmentation de la flexibilité des peptides entraine une perte de l'immunogénicité, induite par une diminution des opportunités d'interaction avec les TCR et une diminution du temps de demi-vie pour les complexes peptide-CMH-I (Insaidoo et al., 2011; Sharma et al., 2001). De plus, la vérification de leur immunogénicité permet de renforcer l'efficacité des systèmes de

prédiction, puisque les peptides réellement immunogènes incrémentes la base de données des épitopes présentés et immunogènes. La stratégie utilisée pour ces deux études permet l'analyse d'une partie seulement des néoantigènes. En effet, beaucoup sont certainement éliminés lors des étapes de sélections des mutations et aussi par les algorithmes, qui à eux seuls, perdent 15% des peptides immunogènes proposés (Fritsch et al., 2014b).

La compréhension des réponses immunitaires dans l'élimination des tumeurs est l'un des principaux sujets de recherche pour lutter efficacement contre le cancer. De récentes études montrent un lien étroit avec le microbiote de l'individu et l'efficacité des traitements antitumoraux (Alexander et al., 2017; Zitvogel et al., 2016). Cette nouvelle branche d'étude met l'accent sur une prise en compte de l'individu dans son état global, sur l'effet des traitements sur la totalité de l'organisme et non plus seulement sur les cellules cancéreuses, ou son microenvironnement. Ces études mettent aussi l'accent sur l'importance des divers effets de l'association des thérapies. La plupart des essais cliniques en cours s'intéressent pour l'instant à l'utilisation seule des inhibiteurs des immune checkpoint, en comparaison à l'efficacité du Sorafenib par exemple. Il serait intéressant de voir les bénéfices cumulés par l'utilisation de ces deux traitements. Ce type de thérapie, utilisant des anticorps monoclonaux contre les immunes checkpoints, est une méthode émergente et donc reste aujourd'hui encore plus couteuse que les thérapies conventionnelles. Les thérapies personnalisées, ciblant notamment les néoépitopes, semblent être le moyen le plus fiable pour tenter d'endiguer cette pathologie, mais les couts d'une personnalisation des traitements est encore aujourd'hui trop élevé. Beaucoup d'études sont réalisées pour tenter d'identifier des marqueurs pronostiques afin d'orienter au mieux les thérapies. Cette démarche correspond à un premier pas vers cette personnalisation des traitements. Finalement, la présence de réponses immunitaires T antitumorales, notamment contre des néoantigènes, pourrait apparaitre à l'avenir à elle seule comme un biomarqueur pronostique pour les CHC mais aussi pour les CRC, et pourquoi pas devenir un marqueur de réponse aux différents traitements anti-cancéreux connus pour activer les réponses immunitaires antitumorales.

Certaines chimiothérapies sont connues pour entrainer des lymphopénies qui pourraient alors être un marqueur de mauvais pronostic pour les patients. Il a été proposé que plusieurs chimiothérapies utilisées à des doses métronomiques puissent moduler favorablement les réponses immunitaires, contrairement à une dose clinique (Ghiringhelli et al., 2007). Cependant, peut-être que l'effet cytotoxique de ces chimiothérapies utilisées à doses métronomiques ne serait pas suffisamment puissant pour induire la mort des cellules tumorales, permettant aussi de générer une source d'antigènes tumoraux pour les CPA et d'activer les lymphocytes T. Il a été démontré dans un cas de réponse complète d'un mélanome après traitement par Ipilimumab (anti-CTLA-4) des réponses T spécifiques contre deux néoantigènes, dont l'un d'entre eux avait une expression fortement augmentée après traitement (van Rooij et al., 2013). De plus, l'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 potentialiserait l'effet *epitope spreading* des réponses T CD8⁺ spécifiques de tumeurs (Memarnejadian et al., 2017). L'échappement des antigènes clonaux non présentés par les CMH aux lymphocytes T conduit alors à l'échappement de ces antigènes à l'immunosurveillance (Marty et al., 2017). Or, les néoantigènes échappent aussi à la sélection pouvant induire une tolérance du système immunitaire à leur encontre. Ainsi, une vaccination ciblant ces néoantigènes permettrait de favoriser ces réponses T spécifiques qui auraient une très forte avidité pour ces néopeptides-CMH et qui pourraient alors potentiellement contrer la faible quantité de néopeptides clonaux présentés en surface.

L'apparition de néoépitopes permettrait d'outrepasser l'immunosuppression installée. La création de néoépitopes, mais aussi la modulation de l'immunité antitumorale, peut être induite par des traitements antitumoraux et pourrait alors conduire à l'élimination des cellules tumorales. De plus, l'utilisation d'immunothérapies ciblant des néoantigènes créés par un agent mutagène antitumoral qui pourrait toujours cibler les mêmes séquences de l'ADN permettrait d'anticiper les néoantigènes créés et de favoriser les réponses immunitaires antitumorales en l'associant à des vaccins.

A défaut de pouvoir analyser les réponses immunitaires qui peuvent ainsi varier en qualité et en quantité tout au long du traitement, l'étude des mutations des cellules tumorales pourrait aussi être un marqueur pour le pronostic des patients. Des mutations ont déjà été identifiées comme marqueur pronostique, comme les mutations KRAS, BRAF ou APC dans les CRC (Schell et al., 2016; Thiel and Ristimäki, 2013) ou aussi pour l'efficacité des traitements, comme déjà démontré pour l'anti-CTLA-4, l'anti-PD-1 ou le FOLFOX.

Bibliographie

Ackerman, A.L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006). A Role for the Endoplasmic Reticulum Protein Retrotranslocation Machinery during Crosspresentation by Dendritic Cells. Immunity *25*, 607–617.

Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. Nat. Rev. Immunol. *3*, 939–951.

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4⁺ T cells. Nat. Immunol. *3*, ni794.

Agarwal, A., Verma, S., Burra, U., Murthy, N.S., Mohanty, N.K., and Saxena, S. (2006). Flow Cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of Superficial Transitional cell carcinoma of bladder. Cancer Immunol. Immunother. *55*, 734–743.

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J. Biol. Chem. *278*, 1910–1914.

Ahmed, D., Eide, P.W., Eilertsen, I.A., Danielsen, S.A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G.E., and Lothe, R.A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. Oncogenesis 2, e71.

Albert, M.L., Pearce, S.F.A., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via $\alpha\nu\beta5$ and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes. J. Exp. Med. *188*, 1359–1368.

Alexander, J.L., Wilson, I.D., Teare, J., Marchesi, J.R., Nicholson, J.K., and Kinross, J.M. (2017). Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. *14*, nrgastro.2017.20.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. Nature *500*, 415–421.

Allan, R.S., Zueva, E., Cammas, F., Schreiber, H.A., Masson, V., Belz, G.T., Roche, D., Maison, C., Quivy, J.-P., Almouzni, G., et al. (2012). An epigenetic silencing pathway controlling T helper 2 cell lineage commitment. Nature *487*, 249–253.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., et al. (2007). Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nat. Med. *13*, 1050–1059.

Apetoh, L., Mignot, G., Panaretakis, T., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2008). Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. Trends Mol. Med. *14*, 141–151.

Aquino, A., Prete, S.P., Guadagni, F., Greiner, J.W., Giuliani, A., Orlando, L., Masci, G., De Santis, S., Bonmassar, E., and Graziani, G. (2000). Effect of 5-fluorouracil on carcinoembryonic antigen expression and shedding at clonal level in colon cancer cells. Anticancer Res. 20, 3475–3484.

Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H.-G., Salle, H. de la, and Schild, H. (1999). Cutting Edge: Receptor-Mediated Endocytosis of Heat Shock Proteins by Professional Antigen-Presenting Cells. J. Immunol. *162*, 3757–3760.

Arpaia, N., Cassano, N., and Vena, G.A. (2006). Regressing cutaneous malignant melanoma and vitiligo-like depigmentation. Int. J. Dermatol. *45*, 952–956.

Aryee, M.J., Liu, W., Engelmann, J.C., Nuhn, P., Gurel, M., Haffner, M.C., Esopi, D., Irizarry, R.A., Getzenberg, R.H., Nelson, W.G., et al. (2013). DNA methylation alterations exhibit intraindividual stability and inter-individual heterogeneity in prostate cancer metastases. Sci. Transl. Med. *5*, 169ra10.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. Science 281, 1305–1308.

Aue, G., Njuguna, N., Tian, X., Soto, S., Hughes, T., Vire, B., Keyvanfar, K., Gibellini, F., Valdez, J., Boss, C., et al. (2009). Lenalidomide-induced upregulation of CD80 on tumor cells correlates with T-cell activation, the rapid onset of a cytokine release syndrome and leukemic cell clearance in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica *94*, 1266–1273.

Aymeric, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Martins, I., Kroemer, G., Smyth, M.J., and Zitvogel, L. (2010). Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity. Cancer Res. *70*, 855–858.

Ayyoub, M., Mazarguil, H., Monsarrat, B., Van den Eynde, B., and Gairin, J.E. (1999). A structure-based approach to designing non-natural peptides that can activate anti-melanoma cytotoxic T cells. J. Biol. Chem. *274*, 10227–10234.

Ayyoub, M., Migliaccio, M., Guillaume, P., Liénard, D., Cerottini, J.C., Romero, P., Lévy, F., Speiser, D.E., and Valmori, D. (2001). Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. Eur. J. Immunol. *31*, 2642–2651.

Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001). CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. J. Immunol. *167*, 1245–1253.

Bailey, S.R., Nelson, M.H., Himes, R.A., Li, Z., Mehrotra, S., and Paulos, C.M. (2014). Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. Tumor Immun. *5*, 276.

Bakker, A.B., Schreurs, M.W., de Boer, A.J., Kawakami, Y., Rosenberg, S.A., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (1994). Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. J. Exp. Med. *179*, 1005–1009.

Balachandran, V.P., Cavnar, M.J., Zeng, S., Bamboat, Z.M., Ocuin, L.M., Obaid, H., Sorenson, E.C., Popow, R., Ariyan, C., Rossi, F., et al. (2011). Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. Nat. Med. *17*, nm.2438.

Balachandran, V.P., Łuksza, M., Zhao, J.N., Makarov, V., Moral, J.A., Remark, R., Herbst, B., Askan, G., Bhanot, U., Senbabaoglu, Y., et al. (2017). Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. Nature nature24462.

Baumgaertner, P., Rufer, N., Devevre, E., Derre, L., Rimoldi, D., Geldhof, C., Voelter, V., Liénard, D., Romero, P., and Speiser, D.E. (2006). Ex vivo Detectable Human CD8 T-Cell Responses to Cancer-Testis Antigens. Cancer Res. *66*, 1912–1916.

Berzofsky, J.A., Terabe, M., and Wood, L.V. (2012). Strategies to use immune modulators in therapeutic vaccines against cancer. Semin. Oncol. *39*, 348–357.

Bicknell, D.C., Rowan, A., and Bodmer, W.F. (1994). Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 4751–4755.

Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. Semin. Immunopathol. *35*, 585–600.

Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. Annu. Rev. Immunol. *31*, 443–473.

Boël, P., Wildmann, C., Sensi, M.L., Brasseur, R., Renauld, J.C., Coulie, P., Boon, T., and van der Bruggen, P. (1995). BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. Immunity *2*, 167–175.

Böhm, S., Montfort, A., Pearce, O.M.T., Topping, J., Chakravarty, P., Everitt, G.L.A., Clear, A., McDermott, J.R., Ennis, D., Dowe, T., et al. (2016). Neoadjuvant Chemotherapy Modulates the Immune Microenvironment in Metastases of Tubo-Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. Clin. Cancer Res. *22*, 3025–3036.

Bonertz, A., Weitz, J., Pietsch, D.-H.K., Rahbari, N.N., Schlude, C., Ge, Y., Juenger, S., Vlodavsky, I., Khazaie, K., Jaeger, D., et al. (2009). Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. J. Clin. Invest. *119*, 3311–3321.

Bonnotte, B., Crittenden, M., Larmonier, N., Gough, M., and Vile, R.G. (2004). MIP-3α Transfection into a Rodent Tumor Cell Line Increases Intratumoral Dendritic Cell Infiltration but Enhances (Facilitates) Tumor Growth and Decreases Immunogenicity. J. Immunol. *173*, 4929–4935.

Boon, T., De Plaen, E., Lurquin, C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Traversari, C., Amar-Costesec, A., and Van Pel, A. (1992). Identification of tumour rejection antigens recognized by T lymphocytes. Cancer Surv. *13*, 23–37.

Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. *12*, 337–365.

Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. Annu. Rev. Immunol. 24, 175–208.

Bos, R., and Sherman, L.A. (2010). CD4+ T cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. Cancer Res. *70*, 8368–8377.

Bose, R.N., Maurmann, L., Mishur, R.J., Yasui, L., Gupta, S., Grayburn, W.S., Hofstetter, H., and Salley, T. (2008). Non-DNA-binding platinum anticancer agents: Cytotoxic activities of platinum–phosphato complexes towards human ovarian cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 18314–18319.

Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). A Role for CD40 Expression on CD8+ T Cells in the Generation of CD8+ T Cell Memory. Science *297*, 2060–2063.

Bracci, L., Schiavoni, G., Sistigu, A., and Belardelli, F. (2014). Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. Cell Death Differ. *21*, 15–25.

Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Wölfel, C., De Plaen, E., Lethé, B., Coulie, P., and Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. J. Exp. Med. *178*, 489–495.

van den Broek, M.E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., Melief, C.J., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforindeficient mice. J. Exp. Med. *184*, 1781–1790.

van den Broeke, L.T., Pendleton, C.D., Mackall, C., Helman, L.J., and Berzofsky, J.A. (2006). Identification and epitope enhancement of a PAX-FKHR fusion protein breakpoint epitope in alveolar rhabdomyosarcoma cells created by a tumorigenic chromosomal translocation inducing CTL capable of lysing human tumors. Cancer Res. *66*, 1818–1823.

Brown, S.D., Warren, R.L., Gibb, E.A., Martin, S.D., Spinelli, J.J., Nelson, B.H., and Holt, R.A. (2014). Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. Genome Res. *24*, 743–750.

de Bruin, E.C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D.C., Yates, L., Jamal-Hanjani, M., Shafi, S., Murugaesu, N., Rowan, A.J., et al. (2014). Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. Science *346*, 251–256.

Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach. Br. Med. J. 1, 779–786.

Cabrera, R., Ararat, M., Xu, Y., Brusko, T., Wasserfall, C., Atkinson, M.A., Chang, L.J., Liu, C., and Nelson, D.R. (2013). Immune modulation of effector CD4+ and regulatory T cell function by sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Immunol. Immunother. CII *62*.

Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Phenotypic and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. Nat. Rev. Immunol. *11*, 119–130.

Cao, M., Cabrera, R., Xu, Y., Firpi, R., Zhu, H., Liu, C., and Nelson, D.R. (2007). Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. 87, 582–590.
Cao, M., Xu, Y., Youn, J., Cabrera, R., Zhang, X., Gabrilovich, D., Nelson, D.R., and Liu, C. (2011). Kinase Inhibitor Sorafenib Modulates Immunosuppressive Cell Populations in a Murine Liver Cancer Model. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *91*, 598–608.

Cao, X., Leonard, K., Collins, L.I., Cai, S.F., Mayer, J.C., Payton, J.E., Walter, M.J., Piwnica-Worms, D., Schreiber, R.D., and Ley, T.J. (2009). Interleukin 12 Stimulates IFN-γ–Mediated Inhibition of Tumor-Induced Regulatory T-Cell Proliferation and Enhances Tumor Clearance. Cancer Res. *69*, 8700–8709.

Caron, E., Vincent, K., Fortier, M.-H., Laverdure, J.-P., Bramoullé, A., Hardy, M.-P., Voisin, G., Roux, P.P., Lemieux, S., Thibault, P., et al. (2011). The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. Mol. Syst. Biol. *7*, 533.

Carrasco, J., Pel, A.V., Neyns, B., Lethé, B., Brasseur, F., Renkvist, N., Bruggen, P. van der, Baren, N. van, Paulus, R., Thielemans, K., et al. (2008). Vaccination of a Melanoma Patient with Mature Dendritic Cells Pulsed with MAGE-3 Peptides Triggers the Activity of Nonvaccine Anti-Tumor Cells. J. Immunol. *180*, 3585–3593.

Carreno, B.M., Magrini, V., Becker-Hapak, M., Kaabinejadian, S., Hundal, J., Petti, A.A., Ly, A., Lie, W.-R., Hildebrand, W.H., Mardis, E.R., et al. (2015). A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. Science aaa3828.

Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. Eur. J. Immunol. *30*, 1538–1543.

Celis, E., Fikes, J., Wentworth, P., Sidney, J., Southwood, S., Maewal, A., Del Guercio, M.-F., Sette, A., and Livingston, B. (1994). Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles. Mol. Immunol. *31*, 1423–1430.

Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G., and Allison, J.P. (2001). CTLA-4-Mediated Inhibition in Regulation of T Cell Responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. Annu. Rev. Immunol. 19, 565–594.

Chaney, S.G., Campbell, S.L., Bassett, E., and Wu, Y. (2005). Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *53*, 3–11.

Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., Gairin, J.-E., Morel, S., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., et al. (2006). Destructive Cleavage of Antigenic Peptides Either by the Immunoproteasome or by the Standard Proteasome Results in Differential Antigen Presentation. J. Immunol. *176*, 1053–1061.

Charbonnier, A.-S., Kohrgruber, N., Kriehuber, E., Stingl, G., Rot, A., and Maurer, D. (1999). Macrophage Inflammatory Protein 3α Is Involved in the Constitutive Trafficking of Epidermal Langerhans Cells. J. Exp. Med. *190*, 1755–1768.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). Interaction with self antigens selects some lymphocytes for survival but eliminates others.

Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., et al. (2009). The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. Clin. Cancer Res. *15*, 5323–5337.

Chen, G., and Emens, L.A. (2013). Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. Cancer Immunol. Immunother. CII *62*, 203–216.

Chen, D., Hu, Q., Mao, C., Jiao, Z., Wang, S., Yu, L., Xu, Y., Dai, D., Yin, L., and Xu, H. (2012). Increased IL-17-producing CD4+ T cells in patients with esophageal cancer. Cell. Immunol. 272, 166–174.

Chen, M.-L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 419–424.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. J. Exp. Med. *198*, 1875–1886.

Chen, Y.-T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Türeci, Ö., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 1914–1918.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell *81*, 505–512.

Cibotti, R., Kanellopoulos, J.M., Cabaniols, J.P., Halle-Panenko, O., Kosmatopoulos, K., Sercarz, E., and Kourilsky, P. (1992). Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 416–420.

Cobbold, M., De La Peña, H., Norris, A., Polefrone, J., Qian, J., English, A.M., Cummings, K., Penny, S., Turner, J.E., Cottine, J., et al. (2013). MHC class-I associated phosphopeptides are the targets of memory-like immunity in leukemia. Sci. Transl. Med. *5*, 203ra125.

Cohen, C.J., Gartner, J.J., Horovitz-Fried, M., Shamalov, K., Trebska-McGowan, K., Bliskovsky, V.V., Parkhurst, M.R., Ankri, C., Prickett, T.D., Crystal, J.S., et al. (2015). Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. J. Clin. Invest. *125*, 3981–3991.

Cohen, P.A., Peng, L., Plautz, G.E., Kim, J.A., Weng, D.E., and Shu, S. (2000). CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. Crit. Rev. Immunol. *20*, 17–56.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature *450*, 566–569.

Comtesse, N., Heckel, D., Maldener, E., Glass, B., and Meese, E. (2000). Probing the human natural autoantibody repertoire using an immunoscreening approach. Clin. Exp. Immunol. *121*, 430–436.

Corthay, A., Skovseth, D.K., Lundin, K.U., Røsjø, E., Omholt, H., Hofgaard, P.O., Haraldsen, G., and Bogen, B. (2005). Primary Antitumor Immune Response Mediated by CD4+ T Cells. Immunity *22*, 371–383.

Costello, R.T., Gastaut, J.A., and Olive, D. (1999). Tumor escape from immune surveillance. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 47, 83–88.

Coughlin, C.M., Salhany, K.E., Gee, M.S., LaTemple, D.C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J.E., Liu, L., et al. (1998). Tumor Cell Responses to IFNγ Affect Tumorigenicity and Response to IL-12 Therapy and Antiangiogenesis. Immunity *9*, 25–34.

Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., et al. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. J. Exp. Med. *180*, 35–42.

Coulie, P.G., Lehmann, F., Lethé, B., Herman, J., Lurquin, C., Andrawiss, M., and Boon, T. (1995). 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.

Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer *14*, 135–146.

Coussens, L.M., Zitvogel, L., and Palucka, A.K. (2013). Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? Science *339*, 286–291.

Crotzer, V.L., and Blum, J.S. (2010). Autophagy and adaptive immunity. Immunology 131, 9–17.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat. Med. *10*, nm1093.

Dahl, J., Freund, R., Blenis, J., and Benjamin, T.L. (1996). Studies of partially transforming polyomavirus mutants establish a role for phosphatidylinositol 3-kinase in activation of pp70 S6 kinase. Mol. Cell. Biol. *16*, 2728–2735.

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.-C., et al. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. Nat. Immunol. *9*, 1347–1355.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. Nature *417*, nature00766.

De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di Carlo, V., Doglioni, C., and Protti, M.P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. J. Exp. Med. 208, 469–478.

De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariamé, B., Szikora, J.P., Wölfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T. (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning

of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 2274–2278.

De Plaen, E., Lurquin, C., Lethé, B., van der Bruggen, P., Brichard, V., Renauld, J.-C., Coulie, P., Van Pel, A., and Boon, T. (1997). Identification of Genes Coding for Tumor Antigens Recognized by Cytolytic T Lymphocytes. Methods *12*, 125–142.

Delon, J., and Germain, R.N. (2000). Information transfer at the immunological synapse. Curr. Biol. *10*, R923–R933.

Demaria, S., and Formenti, S.C. (2012). Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. Front. Oncol. 2.

Demaria, S., Santori, F.R., Ng, B., Liebes, L., Formenti, S.C., and Vukmanovic, S. (2005). Select forms of tumor cell apoptosis induce dendritic cell maturation. J. Leukoc. Biol. 77, 361–368.

Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Müller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., et al. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 7922–7927.

Derhovanessian, E., Adams, V., Hähnel, K., Groeger, A., Pandha, H., Ward, S., and Pawelec, G. (2009). Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. Int. J. Cancer *125*, 1372–1379.

Desar, I.M.E., Jacobs, J.H.F.M., Hulsbergen-vandeKaa, C.A., Oyen, W.J.G., Mulders, P.F.A., van der Graaf, W.T.A., Adema, G.J., van Herpen, C.M.L., and de Vries, I.J.J.M. (2011). Sorafenib reduces the percentage of tumour infiltrating regulatory T cells in renal cell carcinoma patients. Int. J. Cancer *129*, 507–512.

Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. Immunity *1*, 447–456.

Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2006). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate *Ifng* and silence *Il4* in T helper type 1 cells. Nat. Immunol. 8, ni1424.

Dongre, A.R., Kovats, S., deRoos, P., McCormack, A.L., Nakagawa, T., Paharkova-Vatchkova, V., Eng, J., Caldwell, H., Yates III, J.R., and Rudensky, A.Y. (2001). In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. Eur. J. Immunol. *31*, 1485–1494.

Dönnes, P., and Kohlbacher, O. (2005). Integrated modeling of the major events in the MHC class I antigen processing pathway. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *14*, 2132–2140.

Duan, F., Duitama, J., Al Seesi, S., Ayres, C.M., Corcelli, S.A., Pawashe, A.P., Blanchard, T., McMahon, D., Sidney, J., Sette, A., et al. (2014). Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. J. Exp. Med. *211*, 2231–2248.

Dubey, P., Hendrickson, R.C., Meredith, S.C., Siegel, C.T., Shabanowitz, J., Skipper, J.C.A., Engelhard, V.H., Hunt, D.F., and Schreiber, H. (1997). The Immunodominant Antigen of an Ultraviolet-induced Regressor Tumor Is Generated by a Somatic Point Mutation in the DEAD Box Helicase p68. J. Exp. Med. *185*, 695–706.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. Nat. Immunol. *10*, 857–863.

Duhra, P., and Ilchyshyn, A. (1991). Prolonged survival in metastatic malignant melanoma associated with vitiligo. Clin. Exp. Dermatol. *16*, 303–305.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat. Immunol. *3*, ni1102-991-991.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. Immunity 21, 137–148.

Eastman, A. (1987). The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. Pharmacol. Ther. *34*, 155–166.

Eckert, K., Fuhrmann-Selter, T., and Maurer, H.R. (1997). Docetaxel enhances the expression of E-cadherin and carcinoembryonic antigen (CEA) on human colon cancer cell lines in vitro. Anticancer Res. *17*, 7–12.

Egen, J.G., Kuhns, M.S., and Allison, J.P. (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. Nat. Immunol. *3*, ni0702-611-611.

El-Khoueiry, A.B., Melero, I., Crocenzi, T.S., Welling, T.H., Yau, T.C., Yeo, W., Chopra, A., Grosso, J., Lang, L., Anderson, J., et al. (2015). Phase I/II safety and antitumor activity of nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): CA209-040. J. Clin. Oncol. *33*, LBA101-LBA101.

El-Khoueiry, A.B., Sangro, B., Yau, T.C., Crocenzi, T.S., Welling, T.H., Yeo, W., Chopra, A., Anderson, J., Dela Cruz, C.M., Lang, L., et al. (2016). Phase I/II safety and antitumor activity of nivolumab (nivo) in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): Interim analysis of the CheckMate-040 dose escalation study. J. Clin. Oncol. *34*, 4012–4012.

Ellis, L., Atadja, P.W., and Johnstone, R.W. (2009). Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications. Mol. Cancer Ther. 8, 1409–1420.

Ellyard, J.I., Simson, L., and Parish, C.R. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? Tissue Antigens 70, 1–11.

van Elsas, A., van der Burg, S.H., van der Minne, C.E., Borghi, M., Mourer, J.S., Melief, C.J.M., and Schrier, P.I. (1996). Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen. Eur. J. Immunol. *26*, 1683–1689.

Elyaman, W., Bradshaw, E.M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renauld, J.-C., et al. (2009). IL-9 induces differentiation of TH17

cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 12885–12890.

Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I.S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L.-P., Gimotty, P.A., Gilks, C.B., Lal, P., Zhang, L., et al. (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T_{reg} cells. Nature 475, nature10169.

Fang, D., and Zhu, J. (2017). Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. J. Exp. Med. *214*, 1861–1876.

Felder, M., Kapur, A., Gonzalez-Bosquet, J., Horibata, S., Heintz, J., Albrecht, R., Fass, L., Kaur, J., Hu, K., Shojaei, H., et al. (2014). MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. Mol. Cancer *13*, 129.

Fichtinger-Schepman, A.M., Baan, R.A., Luiten-Schuite, A., van Dijk, M., and Lohman, P.H. (1985). Immunochemical quantitation of adducts induced in DNA by cisdiamminedichloroplatinum (II) and analysis of adduct-related DNA-unwinding. Chem. Biol. Interact. *55*, 275–288.

Fingar, D.C., Richardson, C.J., Tee, A.R., Cheatham, L., Tsou, C., and Blenis, J. (2004). mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. Mol. Cell. Biol. *24*, 200–216.

Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T., and Ioannides, C.G. (1995). 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.

Flecken, T., Schmidt, N., Hild, S., Gostick, E., Drognitz, O., Zeiser, R., Schemmer, P., Bruns, H., Eiermann, T., Price, D.A., et al. (2014). Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8+ T-cell responses in hepatocellular carcinoma. Hepatol. Baltim. Md *59*, 1415–1426.

Foley, E.J. (1953). Antigenic Properties of Methylcholanthrene-induced Tumors in Mice of the Strain of Origin. Cancer Res. *13*, 835–837.

Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. J. Exp. Med. *206*, 3015–3029.

Frederick, D.T., Piris, A., Cogdill, A.P., Cooper, Z.A., Lezcano, C., Ferrone, C.R., Mitra, D., Boni, A., Newton, L.P., Liu, C., et al. (2013). BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 1225–1231.

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat. Rev. Cancer *12*, 298–306.

Friedl, P., den Boer, A.T., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. Nat. Rev. Immunol. *5*, 532–545.

Fritsch, E.F., Rajasagi, M., Ott, P.A., Brusic, V., Hacohen, N., and Wu, C.J. (2014a). HLAbinding properties of tumor neoepitopes in humans. Cancer Immunol. Res. 2, 522–529.

Fritsch, E.F., Hacohen, N., and Wu, C.J. (2014b). Personal neoantigen cancer vaccines. Oncoimmunology 3.

Frost, P., Ng, C.P., Belldegrun, A., and Bonavida, B. (1997). Immunosensitization of Prostate Carcinoma Cell Lines for Lymphocytes (CTL, TIL, LAK)-Mediated Apoptosis via the Fas-Fas-Ligand Pathway of Cytotoxicity. Cell. Immunol. *180*, 70–83.

Fu, J., Xu, D., Liu, Z., Shi, M., Zhao, P., Fu, B., Zhang, Z., Yang, H., Zhang, H., Zhou, C., et al. (2007). Increased Regulatory T Cells Correlate With CD8 T-Cell Impairment and Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients. Gastroenterology *132*, 2328–2339.

Fu, J., Zhang, Z., Zhou, L., Qi, Z., Xing, S., Lv, J., Shi, J., Fu, B., Liu, Z., Zhang, J.-Y., et al. (2013). Impairment of CD4+ cytotoxic T cells predicts poor survival and high recurrence rates in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatol. Baltim. Md *58*, 139–149.

Fucikova, J., Kralikova, P., Fialova, A., Brtnicky, T., Rob, L., Bartunkova, J., and Špíšek, R. (2011). Human Tumor Cells Killed by Anthracyclines Induce a Tumor-Specific Immune Response. Cancer Res. *71*, 4821–4833.

Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K.A., Hosoda, F., Nguyen, H.H., Aoki, M., Hosono, N., Kubo, M., Miya, F., et al. (2012). Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. Nat. Genet. *44*, 760–764.

Gabrielson, A., Wu, Y., Wang, H., Jiang, J., Kallakury, B., Gatalica, Z., Reddy, S., Kleiner, D., Fishbein, T., Johnson, L., et al. (2016). Intratumoral CD3 and CD8 T-cell Densities Associated with Relapse-Free Survival in HCC. Cancer Immunol. Res. *4*, 419–430.

Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2006). Central tolerance: good but imperfect. Immunol. Rev. 209, 290–296.

Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. Nat. Rev. Drug Discov. *11*, 215–233.

Galluzzi, L., Vacchelli, E., Pedro, J.-M.B.-S., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E.E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J.-P., Agostinis, P., et al. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. Oncotarget *5*, 12472–12508.

Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. Cancer Cell *28*, 690–714.

Galon, J., Angell, H.K., Bedognetti, D., and Marincola, F.M. (2013). The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. Immunity *39*, 11–26.

Gao, Q., Qiu, S.-J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.-Y., Xiao, Y.-S., Xu, Y., Li, Y.-W., and Tang, Z.-Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 25, 2586–2593.

Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nat. Med. *17*, 1290–1297.

Gaugler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, J.J., De Plaen, E., Lethé, B., Brasseur, F., and Boon, T. (1994). Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. J. Exp. Med. *179*, 921–930.

Gebhardt, T., and Mackay, L.K. (2012). Local immunity by tissue-resident CD8+ memory T cells. Front. Immunol. *3*.

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., et al. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. N. Engl. J. Med. *366*, 883–892.

Gerloni, M., and Zanetti, M. (2005). CD4 T cells in tumor immunity. Springer Semin. Immunopathol. 27, 37–48.

Germain, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. Cell *76*, 287–299.

Ghebeh, H., Lehe, C., Barhoush, E., Al-Romaih, K., Tulbah, A., Al-Alwan, M., Hendrayani, S.-F., Manogaran, P., Alaiya, A., Al-Tweigeri, T., et al. (2010). Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. Breast Cancer Res. BCR *12*, R48.

Ghiringhelli, F., Ménard, C., Martin, F., and Zitvogel, L. (2006). The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. Immunol. Rev. *214*, 229–238.

Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P.E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Cesne, A.L., Zitvogel, L., and Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. Cancer Immunol. Immunother. *56*, 641–648.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. Nat. Med. *15*, 1170–1178.

Gjertsen, M.K., Buanes, T., Rosseland, A.R., Bakka, A., Gladhaug, I., Søreide, O., Eriksen, J.A., Møller, M., Baksaas, I., Lothe, R.A., et al. (2001). Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. Int. J. Cancer *92*, 441–450.

Glimcher, L.H., and Murphy, K.M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. Genes Dev. *14*, 1693–1711.

Godet, Y., Fabre, E., Dosset, M., Lamuraglia, M., Levionnois, E., Ravel, P., Benhamouda, N., Cazes, A., Pimpec-Barthes, F.L., Gaugler, B., et al. (2012). Analysis of Spontaneous Tumor-Specific CD4 T-cell Immunity in Lung Cancer Using Promiscuous HLA-DR Telomerase-

Derived Epitopes: Potential Synergistic Effect with Chemotherapy Response. Clin. Cancer Res. 18, 2943–2953.

Goel, H.L., and Mercurio, A.M. (2013). VEGF targets the tumour cell. Nat. Rev. Cancer 13, 871–882.

Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases. Physiol. Rev. *91*, 1071–1121.

Gomez-Rodriguez, J., Meylan, F., Handon, R., Hayes, E.T., Anderson, S.M., Kirby, M.R., Siegel, R.M., and Schwartzberg, P.L. (2016). Itk is required for Th9 differentiation via TCR-mediated induction of IL-2 and IRF4. Nat. Commun. 7.

Gonzalez-Aparicio, M., Alzuguren, P., Mauleon, I., Medina-Echeverz, J., Hervas-Stubbs, S., Mancheno, U., Berraondo, P., Crettaz, J., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Prieto, J., et al. (2011). Oxaliplatin in combination with liver-specific expression of interleukin 12 reduces the immunosuppressive microenvironment of tumours and eradicates metastatic colorectal cancer in mice. Gut *60*, 341–349.

Gounaris, E., Blatner, N.R., Dennis, K., Magnusson, F., Gurish, M.F., Strom, T.B., Beckhove, P., Gounari, F., and Khazaie, K. (2009). T-Regulatory Cells Shift from a Protective Anti-Inflammatory to a Cancer-Promoting Proinflammatory Phenotype in Polyposis. Cancer Res. *69*, 5490–5497.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. Science 285, 221–227.

Greaves, M. (2015). Evolutionary Determinants of Cancer. Cancer Discov. 5, 806–820.

Greco, G., Fruci, D., Accapezzato, D., Barnaba, V., Nisini, R., Alimena, G., Montefusco, E., Vigneti, E., Butler, R., Tanigaki, N., et al. (1996). Two brc-abl junction peptides bind HLA-A3 molecules and allow specific induction of human cytotoxic T lymphocytes. Leukemia *10*, 693–699.

Gross, L. (1943). Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line. Cancer Res. *3*, 326–333.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perform pathway to cause autologous target cell death. Immunity *21*, 589–601.

Grulich, A.E., van Leeuwen, M.T., Falster, M.O., and Vajdic, C.M. (2007). Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. The Lancet *370*, 59–67.

Guéry, L., and Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. BioMed Res. Int. 2015.

Guetz, G.D., Lecaille, C., Mariani, P., Bennamoun, M., Uzzan, B., Nicolas, P., Boisseau, A., Sastre, X., Cucherousset, J., Lagorce, C., et al. (2010). Prognostic Impact of Microsatellite

Instability in Colorectal Cancer Patients Treated with Adjuvant FOLFOX. Anticancer Res. *30*, 4297–4301.

Guilloux, Y., Lucas, S., Brichard, V.G., Van Pel, A., Viret, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Lethé, B., Jotereau, F., and Boon, T. (1996). A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. J. Exp. Med. *183*, 1173–1183.

Hanada, K., Yewdell, J.W., and Yang, J.C. (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. Nature 427, nature02240.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646–674.

Hao, J.-J., Lin, D.-C., Dinh, H.Q., Mayakonda, A., Jiang, Y.-Y., Chang, C., Jiang, Y., Lu, C.-C., Shi, Z.-Z., Xu, X., et al. (2016). Spatial intratumor heterogeneity of genetic, epigenetic alterations and temporal clonal evolution in esophageal squamous cell carcinoma. Nat. Genet. *48*, 1500–1507.

Hasegawa, H., Komoda, M., Yamada, Y., Yonezawa, S., Tsutsumida, H., Nagai, K., Atogami, S., Tsuruda, K., Osaka, A., Sasaki, D., et al. (2011). Aberrant overexpression of membraneassociated mucin contributes to tumor progression in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. Leuk. Lymphoma *52*, 1108–1117.

Hashim, D., Boffetta, P., La Vecchia, C., Rota, M., Bertuccio, P., Malvezzi, M., and Negri, E. (2016). The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *27*, 926–933.

Haxhinasto, S., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The AKT–mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. J. Exp. Med. 205, 565–574.

He, G., and Karin, M. (2011). NF- κ B and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. Cell Res. 21, 159–168.

Heemskerk, B., Kvistborg, P., and Schumacher, T.N.M. (2013). The cancer antigenome. EMBO J. 32, 194–203.

Hengartner, H., Odermatt, B., Schneider, R., Schreyer, M., Wälle, G., MacDonald, H.R., and Zinkernagel, R.M. (1988). Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. Nature *336*, 388–390.

Héninger, E., Krueger, T.E.G., and Lang, J.M. (2015). Augmenting Antitumor Immune Responses with Epigenetic Modifying Agents. Front. Immunol. 6.

van Herk, E.H., and te Velde, A.A. (2016). Treg subsets in inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma: Characteristics, role, and therapeutic targets. J. Gastroenterol. Hepatol. *31*, 1393–1404.

Hoechst, B., Ormandy, L.A., Ballmaier, M., Lehner, F., Krüger, C., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2008). A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. Gastroenterology *135*, 234–243.

Horowitz, A.T., Fuks, Z., Okon, E., Biran, S., and Treves, A.J. (1983). The Use of Carcinoembryonic Antigen for Identification of Human Tumor Cells in Malignant Effusions. Oncology *40*, 18–25.

Houbiers, J.G., Nijman, H.W., van der Burg, S.H., Drijfhout, J.W., Kenemans, P., van de Velde, C.J., Brand, A., Momburg, F., Kast, W.M., and Melief, C.J. (1993). In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild-type p53. Eur. J. Immunol. *23*, 2072–2077.

Huang, C.-Y., Wang, Y., Luo, G.-Y., Han, F., Li, Y.-Q., Zhou, Z.-G., and Xu, G.-L. (2017). Relationship Between PD-L1 Expression and CD8+ T-cell Immune Responses in Hepatocellular Carcinoma. J. Immunother. Hagerstown Md 1997.

Huang, J., El-Gamil, M., Dudley, M.E., Li, Y.F., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. (2004). T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 6057–6064.

Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). The Central Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response. J. Exp. Med. *188*, 2357–2368.

Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. Nat. Rev. Immunol. *3*, nri1245.

Hwang, E.S., Hong, J.-H., and Glimcher, L.H. (2005). IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. J. Exp. Med. *202*, 1289–1300.

Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Willart, M.A.M., Muskens, F., Hoogsteden, H.C., Luttmann, W., Ferrari, D., Di Virgilio, F., et al. (2007). Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. Nat. Med. *13*, 913–919.

Insaidoo, F.K., Borbulevych, O.Y., Hossain, M., Santhanagopolan, S.M., Baxter, T.K., and Baker, B.M. (2011). Loss of T Cell Antigen Recognition Arising from Changes in Peptide and Major Histocompatibility Complex Protein Flexibility IMPLICATIONS FOR VACCINE DESIGN. J. Biol. Chem. 286, 40163–40173.

Irving, B.A., Chan, A.C., and Weiss, A. (1993). Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. J. Exp. Med. *177*, 1093–1103.

Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. J. Biol. Chem. 268, 10932–10937.

Jackaman, C., Majewski, D., Fox, S.A., Nowak, A.K., and Nelson, D.J. (2012). Chemotherapy broadens the range of tumor antigens seen by cytotoxic CD8+ T cells in vivo. Cancer Immunol. Immunother. *61*, 2343–2356.

Janeway, C.A., Yagi, J., Conrad, P.J., Katz, M.E., Jones, B., Vroegop, S., and Buxser, S. (1989). T-cell responses to Mls and to bacterial proteins that mimic its behavior. Immunol. Rev. *107*, 61–88.

Jenner, R.G., Townsend, M.J., Jackson, I., Sun, K., Bouwman, R.D., Young, R.A., Glimcher, L.H., and Lord, G.M. (2009). The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 17876–17881.

Johnson, B.E., Mazor, T., Hong, C., Barnes, M., Aihara, K., McLean, C.Y., Fouse, S.D., Yamamoto, S., Ueda, H., Tatsuno, K., et al. (2014). Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. Science *343*, 189–193.

Juneja, V.R., McGuire, K.A., Manguso, R.T., LaFleur, M.W., Collins, N., Haining, W.N., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2017). PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. J. Exp. Med. jem.20160801.

Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. Nature *369*, 369031a0.

Kalathil, S.G., Lugade, A.A., Miller, A., Iyer, R., and Thanavala, Y. (2016). PD-1+ and Foxp3+ T cell reduction correlates with survival of HCC patients after sorafenib therapy. JCI Insight *1*.

Kan, S., Hazama, S., Maeda, K., Inoue, Y., Homma, S., Koido, S., Okamoto, M., and Oka, M. (2012). Suppressive Effects of Cyclophosphamide and Gemcitabine on Regulatory T-Cell Induction In Vitro. Anticancer Res. *32*, 5363–5369.

Kanazawa, M., Yoshihara, K., Abe, H., Iwadate, M., Watanabe, K., Suzuki, S., Endoh, Y., Takita, K.-I., Sekikawa, K., Takenoshita, S., et al. (2005). Effects of PSK on T and Dendritic Cells Differentiation in Gastric or Colorectal Cancer Patients. Anticancer Res. *25*, 443–449.

Kanno, Y., Vahedi, G., Hirahara, K., Singleton, K., and O'Shea, J.J. (2012). Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. Annu. Rev. Immunol. *30*, 707–731.

Kantidakis, T., Saponaro, M., Mitter, R., Horswell, S., Kranz, A., Boeing, S., Aygün, O., Kelly, G.P., Matthews, N., Stewart, A., et al. (2016). Mutation of cancer driver MLL2 results in transcription stress and genome instability. Genes Dev. *30*, 408–420.

Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 7556–7561.

Kaplan, M.H., Hufford, M.M., and Olson, M.R. (2015). The Development and in vivo function of TH9 cells. Nat. Rev. Immunol. *15*, 295–307.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S.L., Miki, T., and Rosenberg, S.A. (1994). 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.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. J. Immunol. *154*, 3961–3968.

Kearney, E.R., Pape, K.A., Loh, D.Y., and Jenkins, M.K. (1994). Visualization of peptidespecific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. Immunity *1*, 327–339.

Keating, G.M. (2017). Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. Target. Oncol. 12, 243–253.

Kennedy, R., and Celis, E. (2008a). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. Immunol. Rev. 222, 129–144.

Kennedy, R., and Celis, E. (2008b). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. Immunol. Rev. 222, 129–144.

Kessler, J.H., Beekman, N.J., Bres-Vloemans, S.A., Verdijk, P., van Veelen, P.A., Kloosterman-Joosten, A.M., Vissers, D.C.J., ten Bosch, G.J.A., Kester, M.G.D., Sijts, A., et al. (2001). Efficient Identification of Novel Hla-A*0201–Presented Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes in the Widely Expressed Tumor Antigen Prame by Proteasome-Mediated Digestion Analysis. J. Exp. Med. *193*, 73–88.

Khemlina, G., Ikeda, S., and Kurzrock, R. (2017). The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. Mol. Cancer *16*.

Khodadoust, M.S., Olsson, N., Wagar, L.E., Haabeth, O.A.W., Chen, B., Swaminathan, K., Rawson, K., Liu, C.L., Steiner, D., Lund, P., et al. (2017). Antigen presentation profiling reveals recognition of lymphoma immunoglobulin neoantigens. Nature *advance online publication*.

Kim, H.-J., and Cantor, H. (2014). CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. Cancer Immunol. Res. 2, 91–98.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 386, 761, 763.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a deathinducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. *14*, 5579–5588.

Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., and Goldberg, A.L. (1999). 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.

Kitajima, M., Ito, T., Tumes, D.J., Endo, Y., Onodera, A., Hashimoto, K., Motohashi, S., Yamashita, M., Nishimura, T., Ziegler, S.F., et al. (2011). Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells. Cancer Res. *71*, 4790–4798.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. Nat. Rev. Immunol. *14*, 377–391.

Klein, O., Ebert, L.M., Zanker, D., Woods, K., Tan, B.S., Fucikova, J., Behren, A., Davis, I.D., Maraskovsky, E., Chen, W., et al. (2013). Flt3 ligand expands CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human subjects. Eur. J. Immunol. *43*, 533–539.

Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. Science 290, 1717–1721.

Knutson, K.L., and Disis, M.L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. Cancer Immunol. Immunother. CII *54*, 721–728.

Kobayashi, M., Kobayashi, H., Pollard, R.B., and Suzuki, F. (1998). A Pathogenic Role of Th2 Cells and Their Cytokine Products on the Pulmonary Metastasis of Murine B16 Melanoma. J. Immunol. *160*, 5869–5873.

Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type-1 inflammation. Nat. Immunol. *10*, 595–602.

Kodumudi, K.N., Woan, K., Gilvary, D.L., Sahakian, E., Wei, S., and Djeu, J.Y. (2010). A Novel Chemoimmunomodulating Property of Docetaxel: Suppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearers. Clin. Cancer Res. *16*, 4583–4594.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature *450*, nature06309.

Komine, O., Hayashi, K., Natsume, W., Watanabe, T., Seki, Y., Seki, N., Yagi, R., Sukzuki, W., Tamauchi, H., Hozumi, K., et al. (2003). The Runx1 Transcription Factor Inhibits the Differentiation of Naive CD4+ T Cells into the Th2 Lineage by Repressing GATA3 Expression. J. Exp. Med. *198*, 51–61.

Kreiter, S., Vormehr, M., van de Roemer, N., Diken, M., Löwer, M., Diekmann, J., Boegel, S., Schrörs, B., Vascotto, F., Castle, J.C., et al. (2015). Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. Nature *520*, 692–696.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. Annu. Rev. Immunol. *31*, 51–72.

Kroenke, M.A., Eto, D., Locci, M., Cho, M., Davidson, T., Haddad, E.K., and Crotty, S. (2012). Bcl6 and Maf Cooperate To Instruct Human Follicular Helper CD4 T Cell Differentiation. J. Immunol. *188*, 3734–3744.

Kryczek, I., Liu, R., Wang, G., Wu, K., Shu, X., Szeliga, W., Vatan, L., Finlayson, E., Huang, E., Simeone, D., et al. (2009a). FOXP3 Defines Regulatory T Cells in Human Tumor and Autoimmune Disease. Cancer Res. *69*, 3995–4000.

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., et al. (2009b). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. Blood *114*, 1141–1149.

Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., and Zou, W. (2009c). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. Blood *114*, 357–359.

Kudo, M. (2017). Immune Checkpoint Inhibition in Hepatocellular Carcinoma: Basics and Ongoing Clinical Trials. Oncology *92*, 50–62.

Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., and Gabrilovich, D.I. (2016). The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. Trends Immunol. *37*, 208–220.

Kuriyama, M., Wang, M.C., Papsidero, L.D., Killian, C.S., Shimano, T., Valenzuela, L., Nishiura, T., Murphy, G.P., and Chu, T.M. (1980). Quantitation of Prostate-specific Antigen in Serum by a Sensitive Enzyme Immunoassay. Cancer Res. *40*, 4658–4662.

Kurosu, T., Ohki, M., Wu, N., Kagechika, H., and Miura, O. (2009). Sorafenib Induces Apoptosis Specifically in Cells Expressing BCR/ABL by Inhibiting Its Kinase Activity to Activate the Intrinsic Mitochondrial Pathway. Cancer Res. *69*, 3927–3936.

Lafaille, M.A.C. de, and Lafaille, J.J. (2009). Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? Immunity *30*, 626–635.

Laheurte, C., Galaine, J., Beziaud, L., Dosset, M., Kerzerho, J., Jacquemard, C., Gaugler, B., Ferrand, C., Dormoy, A., Aubin, F., et al. (2016). Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4+ Th1 responses against telomerase in cancer patients. Oncoimmunology *5*.

Landau, D.A., Carter, S.L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M.S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., et al. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. Cell *152*, 714–726.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. Curr. Opin. Immunol. *12*, 92–98.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2005). Understanding the generation and function of memory T cell subsets. Curr. Opin. Immunol. *17*, 326–332.

Larsson, M., Fonteneau, J.-F., Somersan, S., Sanders, C., Bickham, K., Thomas, E.K., Mahnke, K., and Bhardwaj, N. (2001). Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. Eur. J. Immunol. *31*, 3432–3442.

Le, D.T., and Jaffee, E.M. (2012). Regulatory T-cell Modulation Using Cyclophosphamide in Vaccine Approaches: A Current Perspective. Cancer Res. *72*, 3439–3444.

Lee, V., and Le, D.T. (2015). Efficacy of PD-1 blockade in tumors with MMR deficiency. Immunotherapy *8*, 1–3.

Lee, H.K., Mattei, L.M., Steinberg, B.E., Alberts, P., Lee, Y.H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., and Iwasaki, A. (2010). In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. Immunity *32*, 227–239.

Lee, Y.K., Mukasa, R., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2009). Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. Curr. Opin. Immunol. *21*, 274–280.

Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R.A., Lifke, A., Ferel, D., Wölfel, C., Huber, C., and Wölfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 16013–16018.

Lenschow, D.J., Herold, K.C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Qin, H.Y., Fuchs, E., Singh, B., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. Immunity *5*, 285–293.

Lesterhuis, W.J., Punt, C.J.A., Hato, S.V., Eleveld-Trancikova, D., Jansen, B.J.H., Nierkens, S., Schreibelt, G., de Boer, A., Van Herpen, C.M.L., Kaanders, J.H., et al. (2011). Platinumbased drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. J. Clin. Invest. *121*, 3100–3108.

Lethé, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., De Plaen, E., and Boon, T. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. Int. J. Cancer *76*, 903–908.

Li, C.-W., Chang, P.-Y., and Chen, B.-S. (2016). Investigating the mechanism of hepatocellular carcinoma progression by constructing genetic and epigenetic networks using NGS data identification and big database mining method. Oncotarget *7*, 79453–79473.

Li, P., Gregg, J.L., Wang, N., Zhou, D., O'Donnell, P., Blum, J.S., and Crotzer, V.L. (2005). Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing. Immunol. Rev. *207*, 206–217.

Li, Y., Depontieu, F.R., Sidney, J., Salay, T.M., Engelhard, V.H., Hunt, D.F., Sette, A., Topalian, S.L., and Mariuzza, R.A. (2010). Structural Basis for the Presentation of Tumor-associated MHC Class II-restricted Phosphopeptides to CD4+ T Cells. J. Mol. Biol. *399*, 596–603.

Li, Z., Chen, L., and Qin, Z. (2009). Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. Cell. Mol. Immunol. *6*, 415–422.

Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. J. Immunol. *180*, 5916–5926.

Lieberman, J. (2003). Cell death and immunity: The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat. Rev. Immunol. *3*, nri1083.

Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., et al. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 15137–15142.

Lim, J.P., and Gleeson, P.A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. Immunol. Cell Biol. *89*, icb201120.

Lin, C.-L., Lo, W.-F., Lee, T.-H., Ren, Y., Hwang, S.-L., Cheng, Y.-F., Chen, C.-L., Chang, Y.-S., Lee, S.P., Rickinson, A.B., et al. (2002). Immunization with Epstein-Barr Virus (EBV) peptide-pulsed dendritic cells induces functional CD8+ T-cell immunity and may lead to tumor regression in patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. *62*, 6952–6958.

Linard, B., Bézieau, S., Benlalam, H., Labarrière, N., Guilloux, Y., Diez, E., and Jotereau, F. (2002). A ras-Mutated Peptide Targeted by CTL Infiltrating a Human Melanoma Lesion. J. Immunol. *168*, 4802–4808.

Linette, G.P., Stadtmauer, E.A., Maus, M.V., Rapoport, A.P., Levine, B.L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B.M., Cimino, P.J., et al. (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. Blood *122*, 863–871.

Linnemann, C., van Buuren, M.M., Bies, L., Verdegaal, E.M.E., Schotte, R., Calis, J.J.A., Behjati, S., Velds, A., Hilkmann, H., Atmioui, D. el, et al. (2015). High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. Nat. Med. *21*, 81–85.

Liotta, F., Gacci, M., Frosali, F., Querci, V., Vittori, G., Lapini, A., Santarlasci, V., Serni, S., Cosmi, L., Maggi, L., et al. (2011). Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. BJU Int. *107*, 1500–1506.

Liu, C., Cheng, H., Luo, G., Lu, Y., Jin, K., Guo, M., Ni, Q., and Yu, X. (2017). Circulating regulatory T cell subsets predict overall survival of patients with unresectable pancreatic cancer. Int. J. Oncol. *51*, 686–694.

Liu, W.M., Fowler, D.W., Smith, P., and Dalgleish, A.G. (2010). Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. Br. J. Cancer *102*, 115–123.

Llovet, J.M., Brú, C., and Bruix, J. (1999). Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. Semin. Liver Dis. *19*, 329–338.

Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A.C., Santoro, A., Raoul, J.-L., Forner, A., et al. (2008). Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. N. Engl. J. Med. *359*, 378–390.

Longo, V., Gnoni, A., Casadei Gardini, A., Pisconti, S., Licchetta, A., Scartozzi, M., Memeo, R., Palmieri, V.O., Aprile, G., Santini, D., et al. (2017). Immunotherapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. Oncotarget *8*, 33897–33910.

Lord, G.M., Rao, R.M., Choe, H., Sullivan, B.M., Lichtman, A.H., Luscinskas, F.W., and Glimcher, L.H. (2005). T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. Blood *106*, 3432–3439.

Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat. Rev. Immunol. *5*, 331–342.

Lu, K.T., Kanno, Y., Cannons, J.L., Handon, R., Bible, P., Elkahloun, A.G., Anderson, S.M., Wei, L., Sun, H., O'Shea, J.J., et al. (2011). Functional and Epigenetic Analyses of In Vitrogenerated and In Vivo-derived Interleukin-21-Producing Follicular T helper-like cells. Immunity *35*, 622–632.

Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., et al. (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. J. Clin. Invest. *122*, 4160–4171.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. Clin. Dev. Immunol. 2012.

Lugade, A.A., Kalathil, S., Miller, A., Iyer, R., and Thanavala, Y. (2013). High immunosuppressive burden in advanced hepatocellular carcinoma patients. Oncoimmunology *2*.

Lugli, E., Dominguez, M.H., Gattinoni, L., Chattopadhyay, P.K., Bolton, D.L., Song, K., Klatt, N.R., Brenchley, J.M., Vaccari, M., Gostick, E., et al. (2013). Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. J. Clin. Invest. *123*, 594–599.

Łuksza, M., Riaz, N., Makarov, V., Balachandran, V.P., Hellmann, M.D., Solovyov, A., Rizvi, N.A., Merghoub, T., Levine, A.J., Chan, T.A., et al. (2017). A neoantigen fitness model predicts tumour response to checkpoint blockade immunotherapy. Nature nature24473.

Luo, M., and Fu, L. (2016). The effect of chemotherapy on programmed cell death 1/programmed cell death 1 ligand axis: some chemotherapeutical drugs may finally work through immune response. Oncotarget 7, 29794–29803.

Lupetti, R., Pisarra, P., Verrecchia, A., Farina, C., Nicolini, G., Anichini, A., Bordignon, C., Sensi, M., Parmiani, G., and Traversari, C. (1998). Translation of a Retained Intron in Tyrosinase-related Protein (TRP) 2 mRNA Generates a New Cytotoxic T Lymphocyte (CTL)-defined and Shared Human Melanoma Antigen Not Expressed in Normal Cells of the Melanocytic Lineage. J. Exp. Med. *188*, 1005–1016.

Lynch, T.J., Bondarenko, I., Luft, A., Serwatowski, P., Barlesi, F., Chacko, R., Sebastian, M., Neal, J., Lu, H., Cuillerot, J.-M., et al. (2012). Ipilimumab in Combination With Paclitaxel and Carboplatin As First-Line Treatment in Stage IIIB/IV Non–Small-Cell Lung Cancer: Results From a Randomized, Double-Blind, Multicenter Phase II Study. J. Clin. Oncol. *30*, 2046–2054.

Ma, Y., Galluzzi, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2013). Autophagy and Cellular Immune Responses. Immunity *39*, 211–227.

Maby, P., Tougeron, D., Hamieh, M., Mlecnik, B., Kora, H., Bindea, G., Angell, H.K., Fredriksen, T., Elie, N., Fauquembergue, E., et al. (2015a). 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.

Maby, P., Galon, J., and Latouche, J.-B. (2015b). Frameshift mutations, neoantigens and tumorspecific CD8+ T cells in microsatellite unstable colorectal cancers. Oncoimmunology 5.

Mackensen, A., Carcelain, G., Viel, S., Raynal, M.C., Michalaki, H., Triebel, F., Bosq, J., and Hercend, T. (1994). Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. J. Clin. Invest. *93*, 1397–1402.

Maio, M., Giacomo, A.M.D., Robert, C., and Eggermont, A.M. m (2013). Update on the role of ipilimumab in melanoma and first data on new combination therapies. Curr. Opin. Oncol. *25*, 166–172.

Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M., and Eisenbach, L. (1994). CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. Nature *369*, 369067a0.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factorbeta induces development of the T(H)17 lineage. Nature *441*, 231–234.

Martins, I., Kepp, O., Galluzzi, L., Senovilla, L., Schlemmer, F., Adjemian, S., Menger, L., Michaud, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2010). Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1209*, 77–82.

Marty, R., Kaabinejadian, S., Rossell, D., Slifker, M.J., Haar, J. van de, Engin, H.B., Prisco, N. de, Ideker, T., Hildebrand, W.H., Font-Burgada, J., et al. (2017). MHC-I Genotype Restricts the Oncogenic Mutational Landscape. Cell *0*.

Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., Arthur, C.D., White, J.M., Chen, Y.-S., Shea, L.K., et al. (2012). Cancer Exome Analysis Reveals a T Cell Dependent Mechanism of Cancer Immunoediting. Nature *482*, 400–404.

Matsushita, H., Sato, Y., Karasaki, T., Nakagawa, T., Kume, H., Ogawa, S., Homma, Y., and Kakimi, K. (2016). Neoantigen Load, Antigen Presentation Machinery, and Immune Signatures Determine Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Cancer Immunol. Res.

Mattarollo, S.R., Loi, S., Duret, H., Ma, Y., Zitvogel, L., and Smyth, M.J. (2011). Pivotal Role of Innate and Adaptive Immunity in Anthracycline Chemotherapy of Established Tumors. Cancer Res. *71*, 4809–4820.

Mattes, J., Hulett, M., Xie, W., Hogan, S., Rothenberg, M.E., Foster, P., and Parish, C. (2003). Immunotherapy of Cytotoxic T Cell–resistant Tumors by T Helper 2 Cells. J. Exp. Med. *197*, 387–393.

Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger. Semin. Immunol. 10, 399-415.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. Science 296, 301–305.

Mazor, T., Pankov, A., Johnson, B.E., Hong, C., Hamilton, E.G., Bell, R.J.A., Smirnov, I.V., Reis, G.F., Phillips, J.J., Barnes, M.J., et al. (2015). DNA methylation and somatic mutations converge on cell cycle and define similar evolutionary histories in brain tumors. Cancer Cell 28, 307–317.

Mazor, T., Pankov, A., Song, J.S., and Costello, J.F. (2016). Intratumoral heterogeneity of the epigenome. Cancer Cell 29, 440–451.

McGranahan, N., and Swanton, C. (2015). Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cancer Evolution. Cancer Cell 27, 15–26.

McGranahan, N., Furness, A.J.S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Hiley, C.T., et al. (2016). Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. Science *351*, 1463–1469.

McPherson, A., Roth, A., Laks, E., Masud, T., Bashashati, A., Zhang, A.W., Ha, G., Biele, J., Yap, D., Wan, A., et al. (2016). Divergent modes of clonal spread and intraperitoneal mixing in high-grade serous ovarian cancer. Nat. Genet. *48*, ng.3573.

Meek, D.W., and Marcar, L. (2012). MAGE-A antigens as targets in tumour therapy. Cancer Lett. 324, 126–132.

Melief, C.J.M. (2003). Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? Eur. J. Immunol. *33*, 2645–2654.

Mellins, E.D., and Stern, L.J. (2014). HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. Curr. Opin. Immunol. 26, 115–122.

Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat. Rev. Immunol. *4*, nri1457.

Memarnejadian, A., Meilleur, C.E., Shaler, C.R., Khazaie, K., Bennink, J.R., Schell, T.D., and Haeryfar, S.M.M. (2017). PD-1 Blockade Promotes Epitope Spreading in Anticancer CD8+ T Cell Responses by Preventing Fratricidal Death of Subdominant Clones To Relieve Immunodomination. J. Immunol. ji1700643.

Mennonna, D., Maccalli, C., Romano, M.C., Garavaglia, C., Capocefalo, F., Bordoni, R., Severgnini, M., Bellis, G.D., Sidney, J., Sette, A., et al. (2017). T cell neoepitope discovery in colorectal cancer by high throughput profiling of somatic mutations in expressed genes. Gut *66*, 454–463.

Merlo, A., Casalini, P., Carcangiu, M.L., Malventano, C., Triulzi, T., Mènard, S., Tagliabue, E., and Balsari, A. (2009). FOXP3 Expression and Overall Survival in Breast Cancer. J. Clin. Oncol. *27*, 1746–1752.

Merok, M.A., Ahlquist, T., Røyrvik, E.C., Tufteland, K.F., Hektoen, M., Sjo, O.H., Mala, T., Svindland, A., Lothe, R.A., and Nesbakken, A. (2013). Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. Ann. Oncol. 24, 1274–1282.

Messerschmidt, J.L., Prendergast, G.C., and Messerschmidt, G.L. (2016). How Cancers Escape Immune Destruction and Mechanisms of Action for the New Significantly Active Immune Therapies: Helping Nonimmunologists Decipher Recent Advances. The Oncologist *21*, 233–243.

Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., et al. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell *90*, 785–795.

Michels, T., Shurin, G.V., Naiditch, H., Sevko, A., Umansky, V., and Shurin, M.R. (2012). Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner. J. Immunotoxicol. *9*, 292–300.

Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J., and Wang, R.-F. (2008). Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 15505–15510.

Mizukami, Y., Kono, K., Kawaguchi, Y., Akaike, H., Kamimura, K., Sugai, H., and Fujii, H. (2008). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. Int. J. Cancer *122*, 2286–2293.

Mizukoshi, E., Nakamoto, Y., Arai, K., Yamashita, T., Sakai, A., Sakai, Y., Kagaya, T., Yamashita, T., Honda, M., and Kaneko, S. (2011). Comparative analysis of various tumorassociated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology *53*, 1206–1216.

Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Maby, P., Angelova, M., Tougeron, D., Church, S.E., Lafontaine, L., Fischer, M., Fredriksen, T., et al. (2016). Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. Immunity 44, 698–711.

Modesti, A., D'Orazi, G., Masuelli, L., Modica, A., Scarpa, S., Bosco, M.C., and Forni, G. (1993). Ultrastructural evidence of the mechanisms responsible for interleukin-4-activated rejection of a spontaneous murine adenocarcinoma. Int. J. Cancer *53*, 988–993.

Mohammed, F., Cobbold, M., Zarling, A.L., Salim, M., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Engelhard, V.H., and Willcox, B.E. (2008). Phosphorylation-dependent interaction between antigenic peptides and MHC class I: a molecular basis for presentation of transformed self. Nat. Immunol. *9*, 1236–1243.

Monach, P.A., Meredith, S.C., T.Siegel, C., and Schreiber, H. (1995). A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. Immunity *2*, 45–59.

Morel, S., Lévy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.-L., Monsarrat, B., Velthoven, R.V., Cerottini, J.-C., Boon, T., et al. (2000). Processing of Some Antigens by the Standard Proteasome but Not by the Immunoproteasome Results in Poor Presentation by Dendritic Cells. Immunity *12*, 107–117.

Motyka, B., Korbutt, G., Pinkoski, M.J., Heibein, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., et al. (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. Cell *103*, 491–500.

Mukherjee, P., Dani, A., Bhatia, S., Singh, N., Rudensky, A.Y., George, A., Bal, V., Mayor, S., and Rath, S. (2001). Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on MHC class II is dependent on cytoplasmic proteolysis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *167*, 2632–2641.

Mumberg, D., Monach, P.A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A.Y., Schreiber, R.D., and Schreiber, H. (1999). CD4+ T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN- γ . Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 8633–8638.

Münz, C. (2011). Antigen Processing by Macroautophagy for MHC Presentation. Front. Immunol. 2.

Münz, C. (2012). Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy. Front. Immunol. 3.

Muranski, P., and Restifo, N.P. (2009). Adoptive immunotherapy of cancer using CD4+ T cells. Curr. Opin. Immunol. *21*, 200–208.

Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., et al. (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. Blood *112*, 362–373.

Murphy, K.M., and Stockinger, B. (2010). Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. Nat. Immunol. *11*, 674–680.

Murphy, E., Shibuya, K., Hosken, N., Openshaw, P., Maino, V., Davis, K., Murphy, K., and O'Garra, A. (1996). Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. J. Exp. Med. *183*, 901–913.

Murugaesu, N., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Watkins, T., McGranahan, N., Kumar, S., Abbassi-Ghadi, N., Salm, M., Mitter, R., Horswell, S., et al. (2015). Tracking the genomic evolution of esophageal adenocarcinoma through neoadjuvant chemotherapy. Cancer Discov. *5*, 821–831.

Nair, S.K., Heiser, A., Boczkowski, D., Majumdar, A., Naoe, M., Lebkowski, J.S., Vieweg, J., and Gilboa, E. (2000). Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. Nat. Med. *6*, nm0900_1011.

Nakayama, M. (2015). Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells. Front. Immunol. 5.

Nardiello, T., Jungbluth, A.A., Mei, A., Diliberto, M., Huang, X., Dabrowski, A., Andrade, V.C.C., Wasserstrum, R., Ely, S., Niesvizky, R., et al. (2011). MAGE-A inhibits apoptosis in proliferating myeloma cells through repression of Bax and maintenance of survivin. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 4309–4319.

Neefjes, J., Jongsma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat. Rev. Immunol. *11*, 823–836.

Nicholaou, T., Ebert, L.M., Davis, I.D., McArthur, G.A., Jackson, H., Dimopoulos, N., Tan, B., Maraskovsky, E., Miloradovic, L., Hopkins, W., et al. (2009). Regulatory T-Cell–Mediated Attenuation of T-Cell Responses to the NY-ESO-1 ISCOMATRIX Vaccine in Patients with Advanced Malignant Melanoma. Clin. Cancer Res. *15*, 2166–2173.

Nielsen, M., Lund, O., Buus, S., and Lundegaard, C. (2010). MHC Class II epitope predictive algorithms. Immunology *130*, 319–328.

Nik-Zainal, S., Alexandrov, L.B., Wedge, D.C., Van Loo, P., Greenman, C.D., Raine, K., Jones, D., Hinton, J., Marshall, J., Stebbings, L.A., et al. (2012). Mutational Processes Molding the Genomes of 21 Breast Cancers. Cell *149*, 979–993.

Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E.M., Pardoll, D.M., Bornkamm, G.W., and Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. Eur. J. Immunol. *33*, 1250–1259.

Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. Int. J. Cancer *127*, 759–767.

Noble, A. (2000). Review article: molecular signals and genetic reprogramming in peripheral T-cell differentiation. Immunology *101*, 289–299.

Notta, F., Chan-Seng-Yue, M., Lemire, M., Li, Y., Wilson, G.W., Connor, A.A., Denroche, R.E., Liang, S.-B., Brown, A.M., Kim, J.C., et al. (2016). A RENEWED MODEL OF PANCREAS CANCER EVOLUTION BASED ON GENOMIC REARRANGEMENT PATTERNS. Nature *538*, 378–382.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. Immunity 41, 49–61.

Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. Blood *101*, 2620–2627.

Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M.T., Kolls, J.K., et al. (2005). IL-17 Enhances the Net Angiogenic Activity and In Vivo Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer in SCID Mice through Promoting CXCR-2-Dependent Angiogenesis. J. Immunol. *175*, 6177–6189.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of follicular helper T cells is mediated by IL-21 but independent of TH1, TH2 or TH17 lineages. Immunity *29*, 138–149.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., et al. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat. Med. *13*, 54–61.

Ochsenbein, A.F., Sierro, S., Odermatt, B., Pericin, M., Karrer, U., Hermans, J., Hemmi, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2001). Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. Nature *411*, 35082583.

Oft, M. (2014). IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. Cancer Immunol. Res. 2, 194–199.

Oki, Y., Buglio, D., Zhang, J., Ying, Y., Zhou, S., Sureda, A., Ben-Yehuda, D., Zinzani, P.L., Prince, H.M., Harrison, S.J., et al. (2014). Immune regulatory effects of panobinostat in patients with Hodgkin lymphoma through modulation of serum cytokine levels and T-cell PD1 expression. Blood Cancer J. *4*, bcj201458.

Old, L.J. (1982). Cancer immunology: the search for specificity. Natl. Cancer Inst. Monogr. *60*, 193–209.

Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J., Chou, D., Dos santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., et al. (2009). Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. Immunity *31*, 772.

Ono, M., and Hakomori, S. (2003). Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. Glycoconj. J. 20, 71–78.

O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science *327*, 1098–1102.

Ott, P.A., Hu, Z., Keskin, D.B., Shukla, S.A., Sun, J., Bozym, D.J., Zhang, W., Luoma, A., Giobbie-Hurder, A., Peter, L., et al. (2017). An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. Nature *547*, 217–221.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. Annu. Rev. Immunol. *29*, 71–109.

Owonikoko, T.K., Kowalski, J., Kim, S., Dwivedi, B., Chen, Z., Behera, M., Mayfield, W., Hermann, R.C., Chen, L., Khuri, F.R., et al. (2015). PD-L1, PD-1, and CTLA-4 as prognostic biomarkers in resected non-small cell lung cancer. J. Clin. Oncol. *33*, 7551–7551.

Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.-H. (2009). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. Oncogene *29*, 1093–1102.

Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. Nat. Immunol. *12*, 870–878.

Palucka, K., and Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. Nat. Rev. Cancer *12*, nrc3258.

Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A.-C., Chapman, D.C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., et al. (2009). Mechanisms of preapoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. EMBO J. 28, 578–590.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. Nat. Immunol. *8*, ni1536.

van Panhuys, N., Klauschen, F., and Germain, R.N. (2014). T Cell Receptor-dependent Signal Intensity Dominantly Controls CD4+ T Cell Polarization In Vivo. Immunity *41*, 63–74.

Pardee, A.D., and Butterfield, L.H. (2012). Immunotherapy of hepatocellular carcinoma. Oncoimmunology *1*, 48–55.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer *12*, 252–264.

Pardoll, D.M., and Topalian, S.L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. Curr. Opin. Immunol. *10*, 588–594.

Park, I.A., Hwang, S.-H., Song, I.H., Heo, S.-H., Kim, Y.-A., Bang, W.S., Park, H.S., Lee, M., Gong, G., and Lee, H.J. (2017). Expression of the MHC class II in triple-negative breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and interferon signaling. PLoS ONE *12*.

Parker, K.C., Bednarek, M.A., and Coligan, J.E. (1994). 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.

Parra, D., Rieger, A.M., Li, J., Zhang, Y.-A., Randall, L.M., Hunter, C.A., Barreda, D.R., and Sunyer, J.O. (2012). Pivotal Advance: Peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. J. Leukoc. Biol. *91*, 525–536.

Parsons, D.W., Li, M., Zhang, X., Jones, S., Leary, R.J., Lin, J.C.-H., Boca, S.M., Carter, H., Samayoa, J., Bettegowda, C., et al. (2011). The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. Science *331*, 435–439.

Pasternack, M.S., Verret, C.R., Liu, M.A., and Eisen, H.N. (1986). Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. Nature *322*, 322740a0.

Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. Cell 76, 241-251.

Pauletti, G., Godolphin, W., Press, M.F., and Slamon, D.J. (1996). Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. Oncogene *13*, 63–72.

Peng, J., Hamanishi, J., Matsumura, N., Abiko, K., Murat, K., Baba, T., Yamaguchi, K., Horikawa, N., Hosoe, Y., Murphy, S.K., et al. (2015). Chemotherapy Induces Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression via the Nuclear Factor- κ B to Foster an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. Cancer Res. *75*, 5034–5045.

Pepper, J.W., Scott Findlay, C., Kassen, R., Spencer, S.L., and Maley, C.C. (2009). Cancer research meets evolutionary biology. Evol. Appl. 2, 62–70.

Pere, H., Tanchot, C., Bayry, J., Terme, M., Taieb, J., Badoual, C., Adotevi, O., Merillon, N., Marcheteau, E., Quillien, V., et al. (2012). Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer. Oncoimmunology *1*, 326–333.

Pillaire, M.J., Hoffmann, J.S., Defais, M., and Villani, G. (1995). Replication of DNA containing cisplatin lesions and its mutagenic consequences. Biochimie 77, 803–807.

Pinkoski, M.J., Hobman, M., Heibein, J.A., Tomaselli, K., Li, F., Seth, P., Froelich, C.J., and Bleackley, R.C. (1998). Entry and Trafficking of Granzyme B in Target Cells During Granzyme B-Perforin–Mediated Apoptosis. Blood *92*, 1044–1054.

Pinto, S., Sommermeyer, D., Michel, C., Wilde, S., Schendel, D., Uckert, W., Blankenstein, T., and Kyewski, B. (2014). Misinitiation of intrathymic MART-1 transcription and biased TCR usage explain the high frequency of MART-1-specific T cells. Eur. J. Immunol. *44*, 2811–2821.

Pittet, M.J., Zippelius, A., Speiser, D.E., Assenmacher, M., Guillaume, P., Valmori, D., Liénard, D., Lejeune, F., Cerottini, J.-C., and Romero, P. (2001). Ex Vivo IFN- γ Secretion by Circulating CD8 T Lymphocytes: Implications of a Novel Approach for T Cell Monitoring in Infectious and Malignant Diseases. J. Immunol. *166*, 7634–7640.

Podack, E.R., Young, J.D., and Cohn, Z.A. (1985). Isolation and biochemical and functional characterization of perform 1 from cytolytic T-cell granules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 8629–8633.

Powrie, F., and Maloy, K.J. (2003). Regulating the Regulators. Science 299, 1030–1031.

Press, M.F., Bernstein, L., Thomas, P.A., Meisner, L.F., Zhou, J.Y., Ma, Y., Hung, G., Robinson, R.A., Harris, C., El-Naggar, A., et al. (1997). HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. J. Clin. Oncol. *15*, 2894–2904.

Prete, S.P., Turriziani, M., Massara, M.C., De Rossi, A., Correale, P., De Vecchis, L., Torino, F., Bonmassar, L., and Aquino, A. (2008). Combined effects of 5-Fluorouracil, Folinic acid and Oxaliplatin on the expression of carcinoembryonic antigen in human colon cancer cells: pharmacological basis to develop an active antitumor immunochemotherapy. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR 27, 5.

Protti, M.P., and De Monte, L. (2012). Cross-talk within the tumor microenvironment mediates Th2-type inflammation in pancreatic cancer. Oncoimmunology *1*, 89–91.

Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., et al. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity*. Science *332*, 65–68.

Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H.S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A.M., Khoury, S.J., Fuhlbrigge, R.C., Kuchroo, V.K., et al. (2012). Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9–producing T cells. Nat. Med. *18*, nm.2856.

Qin, Z., and Blankenstein, T. (2000). CD4+ T Cell–Mediated Tumor Rejection Involves Inhibition of Angiogenesis that Is Dependent on IFN γ Receptor Expression by Nonhematopoietic Cells. Immunity 12, 677–686.

Quail, D., and Joyce, J. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat. Med. 19, 1423–1437.

Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Lyons, D.S., Davis, M.M., and McConnell, H.M. (1996). Kinetic discrimination in T-cell activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 1401–1405.

Rahmani, M., Davis, E.M., Bauer, C., Dent, P., and Grant, S. (2005). Apoptosis Induced by the Kinase Inhibitor BAY 43-9006 in Human Leukemia Cells Involves Down-regulation of Mcl-1 through Inhibition of Translation. J. Biol. Chem. *280*, 35217–35227.

Rai, V., Abdo, J., Alsuwaidan, A.N., Agrawal, S., Sharma, P., and Agrawal, D.K. (2017). Cellular and molecular targets for the immunotherapy of hepatocellular carcinoma. Mol. Cell. Biochem.

Rajasagi, M., Shukla, S.A., Fritsch, E.F., Keskin, D.B., DeLuca, D., Carmona, E., Zhang, W., Sougnez, C., Cibulskis, K., Sidney, J., et al. (2014). Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. Blood *124*, 453–462.

Ramakrishnan, R., Assudani, D., Nagaraj, S., Hunter, T., Cho, H.-I., Antonia, S., Altiok, S., Celis, E., and Gabrilovich, D.I. (2010). Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. J. Clin. Invest. *120*, 1111–1124.

Ramakrishnan, R., Huang, C., Cho, H.-I., Lloyd, M., Johnson, J., Ren, X., Altiok, S., Sullivan, D., Weber, J., Celis, E., et al. (2012). Autophagy Induced by Conventional Chemotherapy Mediates Tumor Cell Sensitivity to Immunotherapy. Cancer Res. *72*, 5483–5493.

Rammensee, H.-G., and Singh-Jasuja, H. (2013). HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach. Expert Rev. Vaccines *12*, 1211–1217.

Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A., and Stevanović, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics *50*, 213–219.

Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J.M., and Chaney, S.G. (1998). Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. Semin. Oncol. 25, 4–12.

Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J., and Cvitkovic, E. (2002). Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin1. Mol. Cancer Ther. *1*, 227–235.

Rech, A.J., and Vonderheide, R.H. (2009). Clinical Use of Anti-CD25 Antibody Daclizumab to Enhance Immune Responses to Tumor Antigen Vaccination by Targeting Regulatory T cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1174*, 99–106.

Redjimi, N., Raffin, C., Raimbaud, I., Pignon, P., Matsuzaki, J., Odunsi, K., Valmori, D., and Ayyoub, M. (2012). CXCR3+ T Regulatory Cells Selectively Accumulate in Human Ovarian Carcinomas to Limit Type I Immunity. Cancer Res. 72, 4351–4360.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (1999). Fcγ Receptor–mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I–restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization. J. Exp. Med. *189*, 371–380.

Reits, E.A., Hodge, J.W., Herberts, C.A., Groothuis, T.A., Chakraborty, M., K.Wansley, E., Camphausen, K., Luiten, R.M., de Ru, A.H., Neijssen, J., et al. (2006). Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. J. Exp. Med. *203*, 1259–1271.

Rimassa, L., and Santoro, A. (2009). Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial. Expert Rev. Anticancer Ther. *9*, 739–745.

Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science *348*, 124–128.

Roberts, S.A., and Gordenin, D.A. (2014). Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. Nat. Rev. Cancer 14, 786–800.

Robinson, J.H., and Delvig, A.A. (2002). Diversity in MHC class II antigen presentation. Immunology *105*, 252–262.

Rocha, B., and Tanchot, C. (2004). Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. Curr. Opin. Immunol. *16*, 259–263.

Roche, P.A., and Cresswell, P. (1991). Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 3150–3154.

Roche, P.A., Teletski, C.L., Karp, D.R., Pinet, V., Bakke, O., and Long, E.O. (1992). Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. EMBO J. *11*, 2841–2847.

Romagnani, S., Maggi, E., Liotta, F., Cosmi, L., and Annunziato, F. (2009). Properties and origin of human Th17 cells. Mol. Immunol. 47, 3–7.

Rongcun, Y., Salazar-Onfray, F., Charo, J., Malmberg, K.J., Evrin, K., Maes, H., Kono, K., Hising, C., Petersson, M., Larsson, O., et al. (1999). Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *163*, 1037–1044.

van Rooij, N., van Buuren, M.M., Philips, D., Velds, A., Toebes, M., Heemskerk, B., van Dijk, L.J.A., Behjati, S., Hilkmann, H., el Atmioui, D., et al. (2013). Tumor Exome Analysis Reveals Neoantigen-Specific T-Cell Reactivity in an Ipilimumab-Responsive Melanoma. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *31*.

Rosenthal, R., McGranahan, N., Herrero, J., Taylor, B.S., and Swanton, C. (2016). deconstructSigs: delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution. Genome Biol. *17*.

Rosmorduc, O., and Desbois-Mouthon, C. (2011). Targeting STAT3 in hepatocellular carcinoma: Sorafenib again.... J. Hepatol. 55, 957–959.

Rubinfeld, B., Upadhyay, A., Clark, S.L., Fong, S.E., Smith, V., Koeppen, H., Ross, S., and Polakis, P. (2006). Identification and immunotherapeutic targeting of antigens induced by chemotherapy. Nat. Biotechnol. *24*, 205–209.

Rubner, Y., Wunderlich, R., Rühle, P.-F., Kulzer, L., Werthmöller, N., Frey, B., Weiss, E.-M., Keilholz, L., Fietkau, R., and Gaipl, U.S. (2012). How Does Ionizing Irradiation Contribute to the Induction of Anti-Tumor Immunity? Front. Oncol. 2.

Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.-C., Barlow, A., and Jr, C.A.J. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. Nature *353*, 353622a0.

Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., and Sette, A. (1993). Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. Cell *74*, 929–937.

Rusakiewicz, S., Semeraro, M., Sarabi, M., Desbois, M., Locher, C., Mendez, R., Vimond, N., Concha, A., Garrido, F., Isambert, N., et al. (2013). Immune Infiltrates Are Prognostic Factors in Localized Gastrointestinal Stromal Tumors. Cancer Res. *73*, 3499–3510.

Sahin, U., Türeci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 11810–11813.

Sahin, U., Derhovanessian, E., Miller, M., Kloke, B.-P., Simon, P., Löwer, M., Bukur, V., Tadmor, A.D., Luxemburger, U., Schrörs, B., et al. (2017). Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. Nature *547*, 222–226.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *155*, 1151–1164.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol. Rev. *182*, 18–32.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol. Rev. *212*, 8–27.

Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. (2009). Tumor-Infiltrating FOXP3+ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. J. Clin. Oncol. *27*, 186–192.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 401, 44385.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. Annu. Rev. Immunol. *22*, 745–763.

Sampson, J.H., Heimberger, A.B., Archer, G.E., Aldape, K.D., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Gilbert, M.R., Herndon, J.E., McLendon, R.E., Mitchell, D.A., et al. (2010). Immunologic Escape After Prolonged Progression-Free Survival With Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Peptide Vaccination in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. J. Clin. Oncol. 28, 4722–4729.

Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcón, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. Nature *458*, 899–903.

Sant, A.J., Beeson, C., McFarland, B., Cao, J., Ceman, S., Bryant, P.W., and Wu, S. (1999). Individual hydrogen bonds play a critical role in MHC class II: peptide interactions: implications for the dynamic aspects of class II trafficking and DM-mediated peptide exchange. Immunol. Rev. *172*, 239–253.

Saris, C.P., van de Vaart, P.J., Rietbroek, R.C., and Blommaert, F.A. (1996). In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. Carcinogenesis *17*, 2763–2769.

Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. Immunity 28, 402–413.

Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., et al. (2008). T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 7797–7802.

Savage, N.D.L., Kimzey, S.L., Bromley, S.K., Johnson, K.G., Dustin, M.L., and Green, J.M. (2002). Polar Redistribution of the Sialoglycoprotein CD43: Implications for T Cell Function. J. Immunol. *168*, 3740–3746.

Sawada, Y., Yoshikawa, T., Nobuoka, D., Shirakawa, H., Kuronuma, T., Motomura, Y., Mizuno, S., Ishii, H., Nakachi, K., Konishi, M., et al. (2012). Phase I Trial of a Glypican-3– Derived Peptide Vaccine for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Immunologic Evidence and Potential for Improving Overall Survival. Clin. Cancer Res. *18*, 3686–3696.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. *17*, 1675–1687.

Schell, M.J., Yang, M., Teer, J.K., Lo, F.Y., Madan, A., Coppola, D., Monteiro, A.N.A., Nebozhyn, M.V., Yue, B., Loboda, A., et al. (2016). A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. Nat. Commun. 7.

Schmitt, E., and Bopp, T. (2012). Amazing IL-9: revealing a new function for an "old" cytokine. J. Clin. Invest. *122*, 3857–3859.

Schreck, S., Friebel, D., Buettner, M., Distel, L., Grabenbauer, G., Young, L.S., and Niedobitek, G. (2009). Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. Hematol. Oncol. *27*, 31–39.

Schreiber, T.H., Wolf, D., Bodero, M., and Podack, E. (2012). Tumor antigen specific iTreg accumulate in the tumor microenvironment and suppress therapeutic vaccination. Oncoimmunology *1*, 642–648.

Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L.B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., et al. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. Nat. Genet. *47*, 505–511.

Schumacher, T., Bunse, L., Pusch, S., Sahm, F., Wiestler, B., Quandt, J., Menn, O., Osswald, M., Oezen, I., Ott, M., et al. (2014). A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. Nature *512*, 324–327.

Schwartz, H.S., and Grindey, G.B. (1973). Adriamycin and Daunorubicin: A Comparison of Antitumor Activities and Tissue Uptake in Mice following Immunosuppression. Cancer Res. *33*, 1837–1844.

Schwartz, O., Arenzana-Seisdedos, F., Heard, J.-M., and Danos, O. (1992). Activation Pathways and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Are Not Altered in CD4+ T Cells Expressing the nef Protein. AIDS Res. Hum. Retroviruses *8*, 545–551.

Seder, R.A., and Ahmed, R. (2003). Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. Nat. Immunol. *4*, 835–842.

Sfanos, K.S., Bruno, T.C., Maris, C.H., Xu, L., Thoburn, C.J., DeMarzo, A.M., Meeker, A.K., Isaacs, W.B., and Drake, C.G. (2008). Phenotypic Analysis of Prostate-Infiltrating Lymphocytes Reveals TH17 and Treg Skewing. Clin. Cancer Res. *14*, 3254–3261.

Shabgah, A.G., Navashenaq, J.G., Shabgah, O.G., Mohammadi, H., and Sahebkar, A. (2017). Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections. Autoimmun. Rev.

Shafer-Weaver, K.A., Watkins, S.K., Anderson, M.J., Draper, L.J., Malyguine, A., Alvord, W.G., Greenberg, N.M., and Hurwitz, A.A. (2009). Immunity to Murine Prostatic Tumors: Continuous Provision of T-Cell Help Prevents CD8 T-Cell Tolerance and Activates Tumor-Infiltrating Dendritic Cells. Cancer Res. *69*, 6256–6264.

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kündig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., and Mak, T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. Science *261*, 609–612.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature *410*, 35074122.

Sharkey, M.S., Lizée, G., Gonzales, M.I., Patel, S., and Topalian, S.L. (2004). CD4+ T-Cell Recognition of Mutated B-RAF in Melanoma Patients Harboring the V599E Mutation. Cancer Res. *64*, 1595–1599.

Sharma, A.K., Kuhns, J.J., Yan, S., Friedline, R.H., Long, B., Tisch, R., and Collins, E.J. (2001). Class I Major Histocompatibility Complex Anchor Substitutions Alter the Conformation of T Cell Receptor Contacts. J. Biol. Chem. *276*, 21443–21449.

Sharma, M.D., Hou, D.-Y., Liu, Y., Koni, P.A., Metz, R., Chandler, P., Mellor, A.L., He, Y., and Munn, D.H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. Blood *113*, 6102–6111.

Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. Eur. J. Cancer *33*, 787–791.

Shen, Y.-C., Lin, Z.-Z., Hsu, C.-H., Hsu, C., Shao, Y.-Y., and Cheng, A.-L. (2013). Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma: An Update. Liver Cancer 2, 345–364.

Shiba, S., Okusaka, T., Ikeda, M., Saito, H., and Ichida, T. (2014). Characteristics of 18 patients with hepatocellular carcinoma who obtained a complete response after treatment with sorafenib. Hepatol. Res. *44*, 1268–1276.

Shurin, G.V., Tourkova, I.L., Kaneno, R., and Shurin, M.R. (2009). Chemotherapeutic Agents in Noncytotoxic Concentrations Increase Antigen Presentation by Dendritic Cells via an IL-12-Dependent Mechanism. J. Immunol. *183*, 137–144.

Shurin, M.R., Lu, L., Kalinski, P., Stewart-Akers, A.M., and Lotze, M.T. (1999). Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. Springer Semin. Immunopathol. 21, 339–359.

Siew, Y.-Y., Neo, S.-Y., Yew, H.-C., Lim, S.-W., Ng, Y.-C., Lew, S.-M., Seetoh, W.-G., Seow, S.-V., and Koh, H.-L. (2015). Oxaliplatin regulates expression of stress ligands in ovarian cancer cells and modulates their susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity. Int. Immunol. 27, 621–632.

Sigalotti, L., Fratta, E., Coral, S., Tanzarella, S., Danielli, R., Colizzi, F., Fonsatti, E., Traversari, C., Altomonte, M., and Maio, M. (2004). Intratumor heterogeneity of cancer/testis

antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. Cancer Res. *64*, 9167–9171.

Silva, M.J., Costa, P., Dias, A., Valente, M., Louro, H., and Boavida, M.G. (2005). Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. Environ. Mol. Mutagen. *46*, 104–115.

Simon, S., and Labarriere, N. (2017). PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? OncoImmunology *0*, e1364828.

Skipper, J.C., Hendrickson, R.C., Gulden, P.H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L., Boon, T., et al. (1996). An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. J. Exp. Med. *183*, 527–534.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 235, 177–182.

Smet, C.D., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V., and Boon, T. (1999). DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes with a CpG-Rich Promoter. Mol. Cell. Biol. *19*, 7327–7335.

Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C.M., and Kapsenberg, M.L. (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. Int. Immunol. *10*, 1593–1598.

Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J.M., Desrichard, A., Walsh, L.A., Postow, M.A., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2014). Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. N. Engl. J. Med. *371*, 2189–2199.

Snyder, A., Nathanson, T., Funt, S.A., Ahuja, A., Buros Novik, J., Hellmann, M.D., Chang, E., Aksoy, B.A., Al-Ahmadie, H., Yusko, E., et al. (2017). Contribution of systemic and somatic factors to clinical response and resistance to PD-L1 blockade in urothelial cancer: An exploratory multi-omic analysis. PLoS Med. *14*, e1002309.

Soeda, A., Morita-Hoshi, Y., Makiyama, H., Morizane, C., Ueno, H., Ikeda, M., Okusaka, T., Yamagata, S., Takahashi, N., Hyodo, I., et al. (2009). Regular Dose of Gemcitabine Induces an Increase in CD14+ Monocytes and CD11c+ Dendritic Cells in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. Jpn. J. Clin. Oncol. *39*, 797–806.

Sokol, C.L., Chu, N.-Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer, T.M., and Medzhitov, R. (2009). Basophils Function as Antigen Presenting Cells for an Allergen-Induced TH2 Response. Nat. Immunol. *10*, 713–720.

Somasundaram, R., Swoboda, R., Caputo, L., Otvos, L., Weber, B., Volpe, P., Belle, P. van, Hotz, S., Elder, D.E., Marincola, F.M., et al. (2006). Human Leukocyte Antigen-A2–Restricted CTL Responses to Mutated BRAF Peptides in Melanoma Patients. Cancer Res. *66*, 3287–3293.

Song, Y., and Yang, J.M. (2017). Role of interleukin (IL)-17 and T-helper (Th)17 cells in cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 493, 1–8.

Sorbye, H., and Dahl, O. (2004). Transient CEA increase at start of oxaliplatin combination therapy for metastatic colorectal cancer. Acta Oncol. Stockh. Swed. *43*, 495–498.

Spisek, R., Charalambous, A., Mazumder, A., Vesole, D.H., Jagannath, S., and Dhodapkar, M.V. (2007). Bortezomib enhances dendritic cell (DC)–mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. Blood *109*, 4839–4845.

Sprent, J., and Kishimoto, H. (2002). The thymus and negative selection. Immunol. Rev. 185, 126–135.

Starobova, H., and Vetter, I. (2017). Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. Front. Mol. Neurosci. 10.

Steinbrink, K., Wölfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J. Immunol. *159*, 4772–4780.

Stemberger, C., Huster, K.M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2007). A Single Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets. Immunity *27*, 985–997.

Stephens, P.J., Tarpey, P.S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D.C., Nik-Zainal, S., Martin, S., Varela, I., Bignell, G.R., et al. (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. Nature *486*, 400–404.

Strachan, D.C., Ruffell, B., Oei, Y., Bissell, M.J., Coussens, L.M., Pryer, N., and Daniel, D. (2013). CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8+ T cells. Oncoimmunology 2.

Stratton, M.R. (2011). Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise. Science *331*, 1553–1558.

Strausberg, R.L., Simpson, A.J.G., Old, L.J., and Riggins, G.J. (2004). Oncogenomics and the development of new cancer therapies. Nature 429, 469–474.

Street, S.E.A., Trapani, J.A., MacGregor, D., and Smyth, M.J. (2002). Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon γ. J. Exp. Med. *196*, 129–134.

Strømhaug, P.E., Berg, T.O., Fengsrud, M., and Seglen, P.O. (1998). Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. Biochem. J. *335*, 217–224.

Sun, L., Xu, G., Liao, W., Yang, H., Xu, H., Du, S., Zhao, H., Lu, X., Sang, X., and Mao, Y. (2017). Clinicopathologic and prognostic significance of regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. Oncotarget.

Sun, X., Suo, J., and Yan, J. (2016). Immunotherapy in human colorectal cancer: Challenges and prospective. World J. Gastroenterol. 22, 6362–6372.

Sutmuller, R.P.M., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N.M., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E.M., Offringa, R., and Melief, C.J.M. (2001). Synergism of Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Blockade and Depletion of Cd25+ Regulatory

T Cells in Antitumor Therapy Reveals Alternative Pathways for Suppression of Autoreactive Cytotoxic T Lymphocyte Responses. J. Exp. Med. *194*, 823–832.

Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (2005). Gemcitabine Selectively Eliminates Splenic Gr-1+/CD11b+ Myeloid Suppressor Cells in Tumor-Bearing Animals and Enhances Antitumor Immune Activity. Clin. Cancer Res. *11*, 6713–6721.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell *100*, 655–669.

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. (2003). Molecular Mechanisms RegulatinG Th1 Immune Responses. Annu. Rev. Immunol. 21, 713–758.

Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical Role for Tumor Necrosis Factor–related Apoptosis-inducing Ligand in Immune Surveillance Against Tumor Development. J. Exp. Med. *195*, 161–169.

Takenoyama, M., Baurain, J.-F., Yasuda, M., So, T., Sugaya, M., Hanagiri, T., Sugio, K., Yasumoto, K., Boon, T., and Coulie, P.G. (2006). A point mutation in the NFYC gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human squamous cell lung carcinoma. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *118*, 1992–1997.

Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., et al. (2010). Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- β -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. J. Immunol. *185*, 842–855.

Tan, C., and Gery, I. (2012). The unique features of Th9 cells and their products. Crit. Rev. Immunol. *32*, 1–10.

Tang, H., Wang, Y., Chlewicki, L.K., Zhang, Y., Guo, J., Liang, W., Wang, J., Wang, X., and Fu, Y.-X. (2016). Facilitating T Cell Infiltration in Tumor Microenvironment Overcomes Resistance to PD-L1 Blockade. Cancer Cell *29*, 285–296.

T R Mosmann, and Coffman, and R.L. (1989). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. Annu. Rev. Immunol. 7, 145–173.

Tatsumi, T., Kierstead, L.S., Ranieri, E., Gesualdo, L., Schena, F.P., Finke, J.H., Bukowski, R.M., Mueller-Berghaus, J., Kirkwood, J.M., Kwok, W.W., et al. (2002). Disease-associated Bias in T Helper Type 1 (Th1)/Th2 CD4+ T Cell Responses Against MAGE-6 in HLA-DRB10401+ Patients With Renal Cell Carcinoma or Melanoma. J. Exp. Med. *196*, 619–628.

Tenzer, S., Peters, B., Bulik, S., Schoor, O., Lemmel, C., Schatz, M.M., Kloetzel, P.-M., Rammensee, H.-G., Schild, H., and Holzhütter, H.-G. (2005). Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *62*, 1025–1037.

Tepper, R.I., Coffman, R.L., and Leder, P. (1992). An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. Science 257, 548–551.

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. Cell Death Differ. *15*, 3–12.

Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., Aymeric, L., Michaud, M., Apetoh, L., Barault, L., et al. (2010). Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. Oncogene *29*, 482–491.

Tewari, M.K., Sinnathamby, G., Rajagopal, D., and Eisenlohr, L.C. (2005). A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. Nat. Immunol. *6*, 287–294.

The Cancer Genome Atlas Research, and Network (2017). Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. Cell *169*, 1327–1341.e23.

Themes, U.F.O. (2016). How T Cells Recognize Antigen: The Role of the Major Histocompatibility Complex.

Thiel, A., and Ristimäki, A. (2013). Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. Front. Oncol. *3*.

Thomas, W.D., and Hersey, P. (1998a). TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Induces Apoptosis in Fas Ligand-Resistant Melanoma Cells and Mediates CD4 T Cell Killing of Target Cells. J. Immunol. *161*, 2195–2200.

Thomas, W.D., and Hersey, P. (1998b). CD4 T cells kill melanoma cells by mechanisms that are independent of Fas (CD95). Int. J. Cancer 75, 384–390.

Topalian, S.L. (1994). MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy. Curr. Opin. Immunol. *6*, 741–745.

Topalian, S.L., Solomon, D., and Rosenberg, S.A. (1989). Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. J. Immunol. *142*, 3714–3725.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. Cancer Res. *71*, 1263–1271.

Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P.F., Lu, Y.-C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Somerville, R.P., Hogan, K., Hinrichs, C.S., et al. (2014). Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. Science *344*, 641–645.

Tran, E., Ahmadzadeh, M., Lu, Y.-C., Gros, A., Turcotte, S., Robbins, P.F., Gartner, J.J., Zheng, Z., Li, Y.F., Ray, S., et al. (2015). Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. Science *350*, 1387–1390.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nat. Rev. Immunol. 2, nri911.

Trapani, J.A., Davis, J., Sutton, V.R., and Smyth, M.J. (2000). Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. Curr. Opin. Immunol. *12*, 323–329.

Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. Nat. Immunol. *10*, 864–871.

Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. Immunity *19*, 641–644.

Tsavaris, N., Kosmas, C., Vadiaka, M., Kanelopoulos, P., and Boulamatsis, D. (2002). Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes.

Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J.M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature *515*, 568–571.

Turcotte, S., Gros, A., Hogan, K., Tran, E., Hinrichs, C.S., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2013). Phenotype and Function of T Cells Infiltrating Visceral Metastases from Gastrointestinal Cancers and Melanoma: Implications for Adoptive Cell Transfer Therapy. J. Immunol. *191*, 2217–2225.

Türeci, O., Usener, D., Schneider, S., and Sahin, U. (2005). Identification of tumor-associated autoantigens with SEREX. Methods Mol. Med. *109*, 137–154.

Türeci, Ö., Vormehr, M., Diken, M., Kreiter, S., Huber, C., and Sahin, U. (2016). Targeting the Heterogeneity of Cancer with Individualized Neoepitope Vaccines. Clin. Cancer Res. *22*, 1885–1896.

Uchi, R., Takahashi, Y., Niida, A., Shimamura, T., Hirata, H., Sugimachi, K., Sawada, G., Iwaya, T., Kurashige, J., Shinden, Y., et al. (2016). Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. PLOS Genet. *12*, e1005778.

Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. Nat. Immunol. *16*, 142–152.

Ugel, S., Scarselli, E., Iezzi, M., Mennuni, C., Pannellini, T., Calvaruso, F., Cipriani, B., Palma, R.D., Ricci-Vitiani, L., Peranzoni, E., et al. (2010). Autoimmune B-cell lymphopenia after successful adoptive therapy with telomerase-specific T lymphocytes. Blood *115*, 1374–1384.

Unitt, E., Rushbrook, S.M., Marshall, A., Davies, S., Gibbs, P., Morris, L.S., Coleman, N., and Alexander, G.J.M. (2005). Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: The role of T-regulatory cells. Hepatology *41*, 722–730.

Ursino, S., Greco, C., Cartei, F., Colosimo, C., Stefanelli, A., Cacopardo, B., Berretta, M., and Fiorica, F. (2012). Radiotherapy and hepatocellular carcinoma: update and review of the literature. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. *16*, 1599–1604.

Vacchelli, E., Vitale, I., Tartour, E., Eggermont, A., Sautès-Fridman, C., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013a). Trial Watch: Anticancer radioimmunotherapy. Oncoimmunology 2, e25595.
Vacchelli, E., Senovilla, L., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013b). Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. OncoImmunology 2, e23510.

Vaisman, A., and Chaney, S.G. (2000). The Efficiency and Fidelity of Translesion Synthesis past Cisplatin and Oxaliplatin GpG Adducts by Human DNA Polymerase β . J. Biol. Chem. 275, 13017–13025.

Van Allen, E.M., Miao, D., Schilling, B., Shukla, S.A., Blank, C., Zimmer, L., Sucker, A., Hillen, U., Foppen, M.H.G., Goldinger, S.M., et al. (2015). Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. Science *350*, 207–211.

Van Den Eynde, B.J., Gaugler, B., Probst-Kepper, M., Michaux, L., Devuyst, O., Lorge, F., Weynants, P., and Boon, T. (1999). A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. J. Exp. Med. *190*, 1793–1800.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science *254*, 1643–1647.

Van Eynde, B.D., Hainaut, P., Hérin, M., Knuth, A., Lemoine, C., Weynants, P., Van Bruggen, P.D., Fauchet, R., and Boon, T. (1989). Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. Int. J. Cancer *44*, 634–640.

Vanneman, M., and Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. Nat. Rev. Cancer *12*, nrc3237.

Varricchi, G., Harker, J., Borriello, F., Marone, G., Durham, S.R., and Shamji, M.H. (2016). T follicular helper (Tfh) cells in normal immune responses and in allergic disorders. Allergy *71*, 1086–1094.

Vauchy, C., Gamonet, C., Ferrand, C., Daguindau, E., Galaine, J., Beziaud, L., Chauchet, A., Henry Dunand, C.J., Deschamps, M., Rohrlich, P.S., et al. (2015). CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes. Int. J. Cancer *137*, 116–126.

Végran, F., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2015). Th9 Cells: A Novel CD4 T-cell Subset in the Immune War against Cancer. Cancer Res. 75, 475–479.

Veldhoen, M., and Stockinger, B. (2006). TGF β 1, a "Jack of all trades": the link with proinflammatory IL-17-producing T cells. Trends Immunol. 27, 358–361.

Vesely, M.D., and Schreiber, R.D. (2013). Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1284*, 1–5.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. Annu. Rev. Immunol. 29, 235–271.

Viaud, S., Flament, C., Zoubir, M., Pautier, P., LeCesne, A., Ribrag, V., Soria, J.-C., Marty, V., Vielh, P., Robert, C., et al. (2011). Cyclophosphamide Induces Differentiation of Th17 Cells in Cancer Patients. Cancer Res. *71*, 661–665.

Vierboom, M.P.M., Nijman, H.W., Offringa, R., Voort, E.I.H. van der, Hall, T. van, Broek, L. van den, Fleuren, G.J., Kenemans, P., Kast, W.M., and Melief, C.J.M. (1997). Tumor Eradication by Wild-type p53-specific Cytotoxic T Lymphocytes. J. Exp. Med. *186*, 695–704.

Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (2013). Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. Cancer Immun. *13*, 15.

Villadangos, J.A., Bryant, R.A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Duménil, A.M., Riese, R.J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G.P., Chapman, H.A., et al. (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. Immunol. Rev. *172*, 109–120.

Villunger, A., and Strasser, A. (1999). The great escape: Is immune evasion required for tumor progression? Nat. Med. *5*, nm0899_874.

Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rébé, C., and Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell–Dependent Antitumor Immunity. Cancer Res. *70*, 3052–3061.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. Science *339*, 1546–1558.

Volpe, E., Touzot, M., Servant, N., Marloie-Provost, M.-A., Hupé, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2009). Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. Blood *114*, 3610–3614.

Volpe, E., Battistini, L., and Borsellino, G. (2015). Advances in T Helper 17 Cell Biology: Pathogenic Role and Potential Therapy in Multiple Sclerosis. Mediators Inflamm. 2015.

Volpert, O.V., Fong, T., Koch, A.E., Peterson, J.D., Waltenbaugh, C., Tepper, R.I., and Bouck, N.P. (1998). Inhibition of Angiogenesis by Interleukin 4. J. Exp. Med. *188*, 1039–1046.

Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L., and Nadler, L.M. (1999). The Telomerase Catalytic Subunit Is a Widely Expressed Tumor-Associated Antigen Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. Immunity *10*, 673–679.

Voron, T., Marcheteau, E., Pernot, S., Colussi, O., Tartour, E., Taieb, J., and Terme, M. (2014). Control of the Immune Response by Pro-Angiogenic Factors. Front. Oncol. *4*.

Vose, B.M., and Bonnard, G.D. (1982). Specific cytotoxicity against autologous tumour and proliferative responses of human lymphocytes grown in interleukin 2. Int. J. Cancer 29, 33–39.

Vries, I.J.M. de, Castelli, C., Huygens, C., Jacobs, J.F.M., Stockis, J., Schuler-Thurner, B., Adema, G.J., Punt, C.J.A., Rivoltini, L., Schuler, G., et al. (2011). Frequency of Circulating Tregs with Demethylated FOXP3 Intron 1 in Melanoma Patients Receiving Tumor Vaccines and Potentially Treg-Depleting Agents. Clin. Cancer Res. *17*, 841–848.

Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. Nat. Rev. Immunol. *8*, 607–618.

Wan, S., Pestka, S., Jubin, R.G., Lyu, Y.L., Tsai, Y.-C., and Liu, L.F. (2012). Chemotherapeutics and Radiation Stimulate MHC Class I Expression through Elevated Interferon-beta Signaling in Breast Cancer Cells. PLoS ONE 7.

Wang, R.-F. (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. Trends Immunol. 22, 269–276.

Wang, H.Y., Lee, D.A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., Shevach, E.M., and Wang, R.-F. (2004). Tumor-Specific Human CD4+ Regulatory T Cells and Their Ligands: Implications for Immunotherapy. Immunity *20*, 107–118.

Wang, R.F., Parkhurst, M.R., Kawakami, Y., Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A. (1996). Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. J. Exp. Med. *183*, 1131–1140.

Wang, R.F., Wang, X., Atwood, A.C., Topalian, S.L., and Rosenberg, S.A. (1999). Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. Science 284, 1351–1354.

Wang, X.-F., Kerzerho, J., Adotevi, O., Nuyttens, H., Badoual, C., Munier, G., Oudard, S., Tu, S., Tartour, E., and Maillère, B. (2008). Comprehensive analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-restricted CD4+ T cell response specific for the tumor-shared antigen survivin in healthy donors and cancer patients. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 431–439.

Wang, Z., Wu, M., and Gou, S. (2016). Toward a better understanding of the oxaliplatin mode of action upon the steric hindrance of 1,2-diaminocyclohexane and its analogue. J. Inorg. Biochem. *157*, 1–7.

Waniczek, D., Lorenc, Z., Śnietura, M., Wesecki, M., Kopec, A., and Muc-Wierzgoń, M. (2017). Tumor-Associated Macrophages and Regulatory T Cells Infiltration and the Clinical Outcome in Colorectal Cancer. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) *65*, 445–454.

Wargo, J.A., Robbins, P.F., Li, Y., Zhao, Y., El-Gamil, M., Caragacianu, D., Zheng, Z., Hong, J.A., Downey, S., Schrump, D.S., et al. (2009). Recognition of NY-ESO-1+ tumor cells by engineered lymphocytes is enhanced by improved vector design and epigenetic modulation of tumor antigen expression. Cancer Immunol. Immunother. CII *58*, 383–394.

Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., and Trapani, J.A. (2006). Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis.

Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J., and Rosenberg, S.A. (1994). Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. Cancer Res. *54*, 1766–1771.

Webster, W.S., Lohse, C.M., Thompson, R.H., Dong, H., Frigola, X., Dicks, D.L., Sengupta, S., Frank, I., Leibovich, B.C., Blute, M.L., et al. (2006). Mononuclear cell infiltration in clearcell renal cell carcinoma independently predicts patient survival. Cancer *107*, 46–53.

Weerkamp, F., Pike-Overzet, K., and Staal, F.J.T. (2006). T-sing progenitors to commit. Trends Immunol. 27, 125–131.

Weiner, H.L. (2001). Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGFbeta-secreting regulatory cells. Microbes Infect. *3*, 947–954.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. J. Exp. Med. 209, 1723–1742.

West, M.A., Wallin, R.P.A., Matthews, S.P., Svensson, H.G., Zaru, R., Ljunggren, H.-G., Prescott, A.R., and Watts, C. (2004). Enhanced Dendritic Cell Antigen Capture via Toll-Like Receptor-Induced Actin Remodeling. Science *305*, 1153–1157.

Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (2000). Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. Curr. Opin. Immunol. *12*, 448–455.

Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R.A., Schwartz, B., Simantov, R., and Kelley, S. (2006). Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. Nat. Rev. Drug Discov. *5*, 835–844.

Wilke, C.M., Bishop, K., Fox, D., and Zou, W. (2011a). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. Trends Immunol. *32*, 603–611.

Wilke, C.M., Kryczek, I., Wei, S., Zhao, E., Wu, K., Wang, G., and Zou, W. (2011b). Th17 cells in cancer: help or hindrance? Carcinogenesis *32*, 643–649.

Wilson, A., Maréchal, C., and MacDonald, H.R. (2001). Biased V β Usage in Immature Thymocytes Is Independent of DJ β Proximity and pT α Pairing. J. Immunol. *166*, 51–57.

Wilson, C.B., Rowell, E., and Sekimata, M. (2009). Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. Nat. Rev. Immunol. *9*, 91–105.

Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., et al. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17–producing helper T cells. Nat. Immunol. *8*, ni1497.

Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4ainsensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. Science *269*, 1281–1284.

Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., Plaen, E.D., Hankeln, T., Buschenfelde, K.M. zum, and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. Science *269*, 1281–1284.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., et al. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. Nat. Med. 7, nm0301_297.

Woynarowski, J.M., Chapman, W.G., Napier, C., Herzig, M.C.S., and Juniewicz, P. (1998). Sequence- and Region-Specificity of Oxaliplatin Adducts in Naked and Cellular DNA. Mol. Pharmacol. *54*, 770–777.

Yamane, H., and Paul, W.E. (2012). Cytokines of the γc family control CD4+ T cell differentiation and function. Nat. Immunol. 13, 1037–1044.

Yang, H.-Z., Ma, Y., Zhou, Y., Xu, L.-M., Chen, X.-J., Ding, W.-B., and Zou, H.-B. (2015). Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. Cancer Lett. *361*, 128–136.

Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., et al. (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. Immunity *29*, 44–56.

Yarchoan, M., Johnson Iii, B.A., Lutz, E.R., Laheru, D.A., and Jaffee, E.M. (2017). Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. Nat. Rev. Cancer *17*, 209–222.

Yewdell, J.W., and Bennink, and J.R. (1999). Immunodominance in Major Histocompatibility Complex Class I–Restricted T Lymphocyte Responses. Annu. Rev. Immunol. *17*, 51–88.

Yin, S., Yang, J., Lin, B., Deng, W., Zhang, Y., Yi, X., Shi, Y., Tao, Y., Cai, J., Wu, C.-I., et al. (2014). Exome sequencing identifies frequent mutation of MLL2 in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. Sci. Rep. *4*, 6036.

Yokosuka, T., Kobayashi, W., Takamatsu, M., Sakata-Sogawa, K., Zeng, H., Hashimoto-Tane, A., Yagita, H., Tokunaga, M., and Saito, T. (2010). Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. Immunity *33*, 326–339.

You, F.-P., Zhang, J., Cui, T., Zhu, R., Lv, C.-Q., Tang, H.-T., and Sun, D.-W. (2017). Th9 cells promote antitumor immunity via IL-9 and IL-21 and demonstrate atypical cytokine expression in breast cancer. Int. Immunopharmacol. *52*, 163–167.

Youngnak-Piboonratanakit, P., Tsushima, F., Otsuki, N., Igarashi, H., Machida, U., Iwai, H., Takahashi, Y., Omura, K., Yokozeki, H., and Azuma, M. (2004). The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role. Immunol. Lett. *94*, 215–222.

Yu, C., Bruzek, L.M., Meng, X.W., Gores, G.J., Carter, C.A., Kaufmann, S.H., and Adjei, A.A. (2005). The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. Oncogene *24*, 1208841.

Zaanan, A., Cuilliere-Dartigues, P., Guilloux, A., Parc, Y., Louvet, C., de Gramont, A., Tiret, E., Dumont, S., Gayet, B., Validire, P., et al. (2010). Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. Ann. Oncol. *21*, 772–780.

Zaks, T.Z., and Rosenberg, S.A. (1998). Immunization with a Peptide Epitope (p369–377) from HER-2/neu Leads to Peptide-specific Cytotoxic T Lymphocytes That Fail to Recognize HER-2/neu+ Tumors. Cancer Res. *58*, 4902–4908.

Zanetti, M. (2015). Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics. J. Immunol. *194*, 2049–2056.

Zarling, A.L., Ficarro, S.B., White, F.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Engelhard, V.H. (2000). Phosphorylated Peptides Are Naturally Processed and Presented by Major Histocompatibility Complex Class I Molecules in Vivo. J. Exp. Med. *192*, 1755–1762.

Zarling, A.L., Polefrone, J.M., Evans, A.M., Mikesh, L.M., Shabanowitz, J., Lewis, S.T., Engelhard, V.H., and Hunt, D.F. (2006). Identification of class I MHC-associated phosphopeptides as targets for cancer immunotherapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 14889–14894.

Zeng, G., Touloukian, C.E., Wang, X., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., and Wang, R.F. (2000). Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *165*, 1153–1159.

Zhang, B., Rong, G., Wei, H., Zhang, M., Bi, J., Ma, L., Xue, X., Wei, G., Liu, X., and Fang, G. (2008). The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. *374*, 533–537.

Zhang, J.-P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.-H., Chen, M.-S., Li, L., Wu, C., Li, S.-P., and Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. J. Hepatol. *50*, 980–989.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., et al. (2003). Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. N. Engl. J. Med. *348*, 203–213.

Zhou, D., and Blum, J.S. (2004). Presentation of cytosolic antigens via MHC class II molecules. Immunol. Res. *30*, 279–290.

Zhou, G., Sprengers, D., Boor, P.P.C., Doukas, M., Schutz, H., Mancham, S., Pedroza-Gonzalez, A., Polak, W.G., Jonge, J. de, Gaspersz, M., et al. (2017). Antibodies Against Immune Checkpoint Molecules Restore Functions of Tumor-Infiltrating T Cells in Hepatocellular Carcinomas. Gastroenterology *153*, 1107–1119.e10.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. Cell Res. 20, 4–12.

Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2003). Stat5 Activation Plays a Critical Role in Th2 Differentiation. Immunity *19*, 739–748.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. Annu. Rev. Immunol. 28, 445–489.

Zhuang, Y., Cheng, P., Liu, X., Peng, L., Li, B., Wang, T., Chen, N., Li, W., Shi, Y., Chen, W., et al. (2014). A pro-inflammatory role for Th22 cells in Helicobacter pylori-associated gastritis. Gut gutjnl-2014-307020.

Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248, 701–702.

Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (2001). Regulation of the immune response by antigen. Science *293*, 251–253.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? J. Clin. Invest. *118*, 1991–2001.

Zitvogel, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2010). Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity. Cell *140*, 798–804.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M.J., and Kroemer, G. (2013). Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. Immunity *39*, 74–88.

Zitvogel, L., Ayyoub, M., Routy, B., and Kroemer, G. (2016). Microbiome and Anticancer Immunosurveillance. ResearchGate *165*, 276–287.

Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. *10*, 248–256.

Annexes

Contents lists available at ScienceDirect

Preventive Medicine





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

High prevalence of abnormal cervical smears in a hospital cohort of French women beyond the upper age limit screening program



Alexandra Luquain ^{a,1}, Essaada Belglaiaa ^{b,c,d,1}, David Guenat ^{a,c}, Sindy Vrecko ^c, Didier Riethmuller ^{a,c,d}, Séverine Valmary-Degano ^{a,c,d}, Isabelle Bedgedjian ^a, Said Chouham ^b, Jean-Luc Prétet ^{a,c,d}, Christiane Mougin ^{a,c,d,*}

^a Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon, F-25000, France

^b Laboratoire de Biologie Cellulaire et Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc

^c Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

d EA 3181, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, FED4234, CIC-1431 F-25000 Besançon, France

ARTICLE INFO

Available online 5 September 2015

Keywords: Pap smears hrHPV HPV 16 Cervical cancer Women aged over 65

ABSTRACT

Objective. To determine the prevalence of cytological abnormalities and high risk Human PapillomaVirus (hrHPV) in cervical smears from French women aged over 65 years who attended the referent Gynecology Clinic of the Besançon University Hospital.

Methods. Between 2002 and 2012, 796 French women aged 66–99 years were cotested for cytology and hrHPV by Hybrid Capture 2 (hc2). hc2-positive cases were subjected to real time PCR for specific HPV 16/18/45 genotyping. Women with normal Pap smears and positive for hrHPV were followed-up every 12 months.

Results. Cytological abnormalities were detected in more than 30% of women and cervical cancers (CC) in 2.9% of women. Benign lesions were more frequent in women aged 66–75 years while (pre)-malignant lesions were preferentially found in women over 76. The prevalence of hrHPV was 22.7%. HPV 16 was the most frequent (23.8%), followed by HPV 45 (7.7%) and HPV 18 (3.9%). The rate of hrHPV increased with the lesion severity and HPV 16 was identified in 50% of CC. Among the followed-up women, those who developed CIN3 were HPV16 positive at study entry.

Conclusion. The study provides important estimates of the prevalence of cervical abnormalities and hrHPV positivity in a French hospital based-population over 65. Findings suggest to consider this high risk population in regards to cervical cancer.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cervical cancer (CC) is a public health problem in women worldwide, affecting 530,000 women and responsible for 275,000 deaths each year. Wide variations exist between high and low-burden countries and incidence rates range from <3 to >50 per 100,000 (Arbyn et al., 2011; Ferlay et al., 2010). In USA, most cases of CC occur in women younger than 50 years of age, but more than 15% are found in

E-mail addresses: alexandra.luquain@orange.fr (A. Luquain),

essaadabelglaiaa@gmail.com (E. Belglaiaa), david.guenat@univ-fcomte.fr (D. Guenat), sindy.vrecko@edu.univ-fcomte.fr (S. Vrecko), didier.riethmuller@univ-fcomte.fr (D. Riethmuller), severine.valmary@univ-fcomte.fr (S. Valmary-Degano), ibedgedjian@chu-besancon.fr (I. Bedgedjian), s.chouham@uiz.ac.ma (S. Chouham),

jean_luc.pretet@univ-fcomte.fr (J.-L. Prétet), christiane.mougin@univ-fcomte.fr (C. Mougin).

women over 65 (American Cancer Society, 2014). Knowledge about pathogenesis has shown that nearly 100% of CC are caused by a persistent high risk Human PapillomaVirus (hrHPV) infection (Schiffman et al., 1993; Walboomers et al., 1999; Wallin et al., 1999). HPV 16 is the most frequently detected genotype worldwide followed, in general, by HPV 18 and HPV 45 (Guardado-Estrada et al., 2014; Monsonego et al., 2015; Munoz et al., 2003; Pretet et al., 2008).

At present, the best way to reduce the number of CC is to implement screening programs to detect precancerous lesions. The Papanicolaou (Pap) test, which was introduced in the 1940s, led to a reduction of up to 60% in the incidence of invasive squamous cervical cancer and mortality due to the disease (La Vecchia et al., 1984; Quinn et al., 1999). In France, CC incidence decreased from an estimated 5100 in 1980 to 3000 cases in 2005 and mortality declined from 2200 to 1000 cases over the same period (Belot et al., 2008). Because of limitations relating to the sensitivity of cervical cytology (Spence et al., 2007), it has recently been recommended to introduce HPV test in clinical practice, including in primary screening (Arbyn et al., 2012; Saslow et al., 2012). Studies in the USA, Canada and Europe indicate that the high risk HPV test may be more

^{*} Corresponding author at: Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CHRU J Minjoz, Bld A Fleming, 25000 Besançon, France. Fax: +33 381669370.

¹ These two authors have contributed equally to the work and must be considered as two first authors.

effective than cytology alone in detecting CIN3 or progressively worse histological findings (Katki et al., 2011; Leinonen et al., 2012; Mayrand et al., 2007; Ogilvie et al., 2012; Ronco et al., 2014). In addition, HPV16, 18 and 45 genotyping would be advantageous to manage hrHPV positive women (Rijkaart et al., 2012; Saraiya et al., 2014; Wright et al., 2015).

The French guidelines for CC screening recommend a Pap smear every three years after two annual consecutive normal smears for women aged 25 to 65 years (Haute Autorité de Santé, 2013). American guidelines also recommend cessation of CC screening at age 65 for adequately screened women with no history of CIN2 + within the last 20 years (Saslow et al., 2012).

In Europe, the number of elderly patients being diagnosed with CC is increasing and the age of screening exit may be raised up to 70 years in some countries (Elfstrom et al., 2015). In 2014, a review of the literature concluded that cervical cancer screening is beneficial for women aged over 60 in order to prevent the occurrence of, and mortality from CC (Elit, 2014).

In this hospital-based retrospective cohort investigation we estimated the rate of pathological smears and the prevalence of hrHPV including HPV 16, 18 and 45 by cotesting in a population of French women aged over 65 who attended the referent Gynecology Clinic of the Besançon University Hospital. This study contributes to the current debate about the value of CC screening after 65 years, taking into account personal characteristics of patients and public health issues.

Patients and methods

Study population and sample collection

Data on cytology and HPV testing were obtained from 796 women aged over 65 (age range 66–99 years, median age 70 years) who attended the Gynecology Clinic of the Besançon University Hospital between January 2002 and December 2012. Patients had been referred to a referent gynecologist for symptoms suggestive of gynecological disorders (i.e. menopausal vaginal symptoms, vaginal itching, abdominal and pelvic pain) or for follow-up of chronic diseases (i.e. grafted patients, autoimmune disorders).

The cohort consisted of 693 women (87%) with no history of cervical cancer screening in our gynecology/pathology medical records and 103 women (13%) having had one Pap smear. As a whole we considered that women were not adequately screened.

Women underwent a pelvic examination and two cervical samples were obtained and used for conventional cytology and HPV testing as we previously described (Dalstein et al., 2004). When necessary, a short course (3–4 weeks) of intravaginal estrogen cream was given. Women with abnormal cytology were clinically managed according to the French guidelines (Anaes, 2002). Women with normal cytology were followed-up by co-testing in line with usual practice in our reference Clinic (Dalstein et al., 2004; Riethmuller et al., 2013).

Cytology data

Cytology results were reported based on the Bethesda System as Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy (NILM) or epithelial cell abnormalities, while abnormalities were classified as Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US), Atypical Squamous Cells – cannot exclude High Grade Squamous Intraepithelial Lesions (ASC-H), Atypical Glandular Cells (AGC), Low grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSIL), High grade SIL (HSIL), and Squamous Cell Carcinoma (SCC) and ADenoCarcinoma (ADC), without knowledge of HPV status.

HPV DNA testing

HPV DNA testing was performed with the *digene*® hc2 High-Risk HPV DNA Test® (hc2) (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) using the

specific HPV RNA probe cocktail for hrHPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68. Presence or absence of HPV DNA in the specimen was defined according to the strength in relative light units (RLU) compared to 1 pg/mL HPV16 DNA-positive control. The sample was considered positive when the ratio of RLU/CO was ≥ 1 .

Samples were stored into a biobank approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes), and for which a declaration of collection and storage of human samples for research use has been sent to the French Ministry of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) (declaration number DC-2014-2086).

DNA extraction from cervical exfoliated cells

DNA was extracted from hc2 positive cases with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Three hundred and twenty microliters of denatured solution were neutralized with 80 μ L of 5 M acetic acid and 3 M potassium acetate. Then, 400 μ L of AL buffer (Qiagen) and 40 μ L proteinase K (Qiagen) were added and the mix was digested overnight at 56 °C. All lysates were processed according to the manufacturer's recommendations; DNA was eluted in 80 μ L of elution buffer.

Real-time PCR

Detection of HPV16, HPV18 and HPV45 DNA as well as albumin gene (*ALB*) DNA copies were performed by real-time PCR with an AB7500 thermocycler (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France) using TaqMan technology. Primers and hydrolysis probes were designed to target a polymorphic region of the E6 gene and *ALB* (Supplementary Table).

A real-time duplex PCR assay was carried out for simultaneous detection of HPV16 and HPV18 DNA as detailed previously (Jacquin et al., 2013).

Detection of HPV45 DNA was conducted in a final volume of 25 μ L containing the 1X Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer (Eurogentec, Seraing, Belgium), 250 nM of probe (Eurogentec) and 4 μ L of DNA sample. The thermal cycling program was 2 min at 50 °C followed by 10 min at 95 °C and then 40 cycles of amplification (95 °C–15 s, 60 °C–1 min).

To discriminate between failed amplification due to technical error and an absence of HPV16 and/or HPV18 and/or HPV45, each cervical sample was also subjected to real-time PCR for the detection of human *ALB* DNA copies as previously described (Laurendeau et al., 1999).

Statistical analysis

Prevalence of NILM and abnormal cytologies, as well as hrHPV and HPV 16/18/45, was calculated with the corresponding 95% confidence intervals (CI), stratified by age category. Prevalence of hrHPV and specific genotypes according to cytology with the associated 95% CI was also calculated. The chi-square test or Fisher's exact test were used to compare trends in HPV frequency by 5-year intervals, and trends in cytology frequency according to age groups. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using the R statistical software version 3.2.0 on the website BiostaTGV (The R Foundation, Vienna, Austria).

Results

Cytology results according to age groups

Age of the 796 women was categorized into 5-year age groups (66-70, 71-75, 76-80 and >81). Among the Pap smears, 546 (68.6%, 95% CI 65.4–71.8) were NILM and 250 (31.4%, 95% CI 28.2–34.6) were abnormal. One hundred and twenty-six samples (15.8%, 95% CI 13.3–

18.3) were diagnosed ASC-US, 2 (0.3%, 95% CI 0–0.7) were in favor of AGC, 8 (1% 95% IC 0.3–1.7) of ASC-H, 59 (7.4%, 95% CI 5.6–9.2) were LSIL, 32 (4%, 95% CI 2.6–5.4) were HSIL, and 23 (2.9%, 95% CI 1.7–4.1) were CC (Table 1). There were half as many cases of ASC-US in women aged over 81 (6.7%, 95% CI 1.5–11.9) compared to the other age groups (16.2–17.4%). LSIL were most prevalent (10.4%, 95% CI 7.5–13.3) in the 66–70 age group, while HSIL were found most frequently (6.6%, 95% CI 1.5–11.7) in 76–80 year old women. During the period 2002 to 2012, 23 women were cytologically diagnosed with CC with a prevalence reaching 5.6% (95% CI 0.8–10.4) in very elderly patients. Eighteen of the 23 CC smears (78.2%, 95% CI 61.3–95.1) were SCC and 5 (21.8%, 95% CI 4.9–38.7) were ADC. Taken together, most patients diagnosed with NILM or benign lesions (\leq LSIL) were aged between 66 and 75 years, while patients with severe lesions (\geq HSIL) were aged 76 and over (p = 0.04).

hrHPV prevalence according to age groups

The prevalence of hrHPV and specific HPV16/18/45 genotypes according to age is presented in Table 2. The overall prevalence of positive hrHPV was 22.7% (95% CI 19.8–25.6) (181/796). Among the 181 samples positive for hrHPV, 5 samples were inadequate for PCR due to insufficient material. The pooled frequency of HPV 16, HPV 18 and HPV 45 infections was 35.4% (95% CI 28.4–42.4) and HPV 16 was the most prevalent genotype (23.8%, 95% CI 17.6–30) followed by HPV 45 (7.7%, 95% CI 3.8–11.6) and HPV 18 (3.9%, 95% CI 1.1–6.7). Three women showed co-infections with HPV 16, 18, and/or 45 (two cases were infected by the 3 genotypes and one case with HPV 16 and HPV 45). The rate of hrHPV and HPV 16/18/45 did not differ significantly between age groups, but there was a trend towards a higher rate of HPV16 in women aged 76–80 years (42.1%, 95% CI 19.9–64.3).

hrHPV prevalence according to cytology

The distribution of hrHPV types according to cytology is presented in Table 3. Among patients with normal smears, 9.5% [(95% CI 7–12), 52/546)] harbored hrHPV. The rate of hrHPV positivity increased with the severity of cytological abnormalities from 25% (95% CI 0–55) in ASC-H, and 28.9% (95% CI 21.1–36.8) in ASC-US to 69.5% (95% CI 57.8–81.3) in LSIL, 90.6% (95% CI 80.5–100) in HSIL and 94.4% (95% CI 83.8–100) in SCC (p < 0.001). Likewise, the prevalence of the 3 specific hrHPV genotypes tested increased from low to high grade lesions. The rate of HPV16 increased statistically with the lesion severity from 3.1% (95% CI 0.1–6.1) in the ASC-US group to 12.5% in ASC-H (95% CI 0–35.4), 15.2% (95% CI 6–24.4) in LSIL, 31.3% (95% CI 15.2–47.4) in HSIL, to reach more than 50% (95% CI 34.9–75.5) in smears showing CC (p < 0.001).

Follow-up

Table 1

Fig. 1 summarizes the follow-up (FU) data over a mean period of 29 months (95% CI 24.9–33) in women with NILM cytology at baseline.

Cytological data according to age in 796 French elderly women tested between 2002 and 2012.

Table 2

Prevalence of hrHPV, HPV 16, HPV 18, HPV 45 according to age group in 796 French elderly women tested between 2002 and 2012.

Age group years	Global cohort	66-70	71–75	76-80	81 and +
n	796	424	192	91	89
hrHPV positive n (%)*	181 (22.7)	106 (25)	39 (20.3)	19 (20.9)	17 (19.1)
HPV 16 n (%) [#]	43 (23.8)	24 (22.6)	6 (15.4)	8 (42.1)	5 (29.4)
HPV 18 n (%) [#]	7 (3.9)	5 (4.7)	2 (5.1)	0	0
HPV 45 n (%) [#]	14 (7.7)	8 (7.6)	3 (7.7)	1 (5.3)	2 (11.8)
Other HPV n (%) [#]	117 (64.6)	69 (65.1)	28 (71.8)	10 (52.6)	10 (58.8)

n: number, hr
HPV: high-risk human papillomavirus,*:% by row,
 #: % in comparison with number of hr
HPV positive.

In this population of 546 women, 52 were tested hrHPV positive. Among these, 31/52 (59.6%) had a mean FU of 25 months (95% CI 18.2–31.8). Persistent hrHPV positivity was observed in 21/31 (67.7%) women; 13 women still had NILM smears, 6 showed cytological mild abnormalities and 2 presented HSIL. The latter lesions were confirmed histopathologically as CIN3 that developed in women positive for HPV16 at study entry. Among the 494 women who had NILM and were hrHPV negative, only 65 (13.2%) had a FU over a mean period of 31 months (95% CI 25.9–36.1). Four of these (4/65, 6.2%) presented mild abnormalities associated with an incident hrHPV infection but none developed HSIL at cytological control and colposcopic examination.

Discussion

High prevalence of cervical abnormalities may be related to low screening coverage

This retrospective study, conducted on a hospital cohort of 796 French women over 65 years for cervical cancer screening, reports a high rate of hrHPV infection as well as of cytological abnormalities of either low or high grade and a notable rate of carcinomas. These findings are in line with those of Mandelblatt et al. who reported 2% of smears with suspected malignancy in a population of poor, elderly and black women from New York (Mandelblatt et al., 1993) but differ from those of Meyer et al., who recorded a 0.34% cancer rate among a large series of 53,644 French women aged 65 to 100 years having had a normal and sufficient cytological FU according to the guidelines (Meyer et al., 2012). Thus, we point out that women attending a referent hospital Gynecology Clinic are at high risk of cervical lesions and are not representative of older women in France. For the vast majority of the studied women (>85%), no history of cervical cancer screening was noted in our gynecology/pathology medical records while a minority of women would have had one Pap smear. Thus, we can reasonably think that these women were largely underscreened. The completeness of the records is however not warranted because (i) screening could have been performed outside the hospital and not necessarily according to the French guidelines, (ii) cervical cancer screening is mainly opportunistic in France (with the exception in some departments), (iii) of the

Age group (years)	Global cohort	66–70	71–75	76–80	81 and $+$
Subjects n (% by row)	796 (100)	424 (53.3)	192 (24.1)	91 (11.4)	89 (11.2)
NILM n (% by column)	546 (68.6)	273 (64.4)	138 (71.9)	64 (70.3)	71 (79.8)
ASC-US n (% by column)	126 (15.8)	74 (17.4)	31 (16.2)	15 (16.5)	6 (6.7)
AGC n (% by column)	2 (0.3)	2 (0.5)	0	0	0
ASC-H n (% by column)	8(1)	3 (0.7)	2(1)	1 (1.1)	2 (2.3)
LSIL n (% by column)	59 (7.4)	44 (10.4)	10 (5.2)	2 (2.2)	3 (3.4)
HSIL n (% by column)	32 (4)	19 (4.5)	5 (2.6)	6 (6.6)	2 (2.2)
Cancer n (% by column)	23 (2.9)	9 (2.1)	6 (3.1)	3 (3.3)	5 (5.6)

n: number, NILM negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, ASC-US: atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-H: atypical squamous cells – cannot exclude a high grade squamous intraepithelial lesions, AGC: atypical glandular cells, LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion, HSIL: high grade SIL.

Cytology	NILM	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	All Cancers	SCC	ADC
hrHPV n (%)	52/546* (9.5)	37/128* (28.9)	2/8* (25)	41/59 (69.5)	29/32 (90.6)	20/23 (87)	17/18 (94.4)	3/5 (60)
HPV 16 n (%)	7/546 (1.3)	4/128 (3.1)	1/8 (12.5)	9/59 (15.2)	10/32 (31.3)	12/23 (52.2)	10/18 (55.6)	2/5 (40)
HPV 18 n (%)	1/546 (0.2)	2/128 (1.6)	0	3/59 (3.4)	1/32 (3.1)	1/23 (4.3)	0	1/5 (20)
HPV45 n (%)	2/546 (0.4)	4/128 (3.1)	0	3/59 (5.1)	2/32 (6.3)	3/23 (13)	3/18 (16.7)	0
Other HPV n (%)	39/546 (7.1)	29/128 (22.7)	0	27/59 (45.8)	18/32 (56.3)	4/23 (17.4)	4/18 (22.2)	0

n: number, hrHPV: high-risk human papillomavirus, NILM: negative for intraepithelial lesion or malignancy, ASC-US: atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-H: atypical squamous cells – cannot exclude a high grade intraepithelial lesion, AGC: atypical glandular cells, LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion, HSIL: high grade SIL, SCC: squamous cell carcinoma, ADC: adenocarcinoma, % by row, *5 samples inadequate for PCR (2 NILM, 2 ASCUS, 1 ASCH).

absence of national cervical cancer screening registry, (iv) of the overwriting of the health insurance data every two years. These findings may also illustrate that the low coverage of Pap smear testing with age in France (57-59% between 25 and 44 years and 42% between 60 and 65 years (DREES, 2015) is mainly responsible for late diagnosis of precancerous and cancerous cervical lesions. Underprivileged French women likely contribute to the high rate of cervical lesions in older women as it was recently confirmed that 33.1% of them aged 25-65 have ever realized a cervical smear in their lives, and more than a third did not know cervical smear (Chappuis et al., 2014). Moreover, several authors have reported that poor prognosis and advanced stage at diagnosis of cervical cancer in elderly women might be explained by the cessation of cervical screening in this population (Andrae et al., 2008; Brun et al., 2003; Ioka et al., 2005; Spayne et al., 2008; Wright et al., 2005). Based on these data and on the fact that pre-cancerous lesions regress less with age (van Oortmarssen and Habbema, 1991), women beyond 65 with inadequate past screening cannot be considered in forming exiting policy.

Otherwise in the general population, a recent case–control study performed on members of two health plans in the United States suggested that the implementation of screening for women aged 65–79 years was associated with a reduced risk of invasive cancer of 78–84% (Kamineni et al., 2013). USA guidelines recommend stopping screening at 65, but in practice, screening continues up to 85 years of age [Sasieni P, personal communication, EUROGIN 2015]. Indeed, Sirovich et al. showed that 43% of American women aged over 65 had cytology screening (Sirovich et al., 2003). As proposed by Castañón et al. stopping screening between age 60 and 69 years in women with a lifetime of adequate negative screening seems sensible. But in the context of increasing life expectancy further screening may be justifiable (Castanon et al., 2014).

hrHPV prevalence is high in older women

As expected in a population at high risk of cervical lesions, the prevalence of hrHPV is high and reaches 22.7%, a prevalence comparable with that reported by Centurioni et al. in a cohort of Italian women older than 60 (Centurioni et al., 2005). Several authors noted a second HPV peak in women older than 55 in Europe, Canada, Central and South America and Africa (Baay et al., 2004; Castle et al., 2006; de Sanjose et al., 2007; Franceschi et al., 2006; Sellors et al., 2002). The increased prevalence of hrHPV among elderly women might reflect higher rates of previous HPV exposure (cohort effect from the generation of the sexual revolution). Nevertheless, we cannot exclude that older women initiating new sexual relationships in later life were exposed to new HPV infection. Moreover, declining immune function with aging may facilitate viral persistence (Garcia-Pineres et al., 2006) or reactivation of latent HPV infection and/or accelerate progression from cervical intraepithelial neoplasia to invasive cancer.

Here, the rate of hrHPV is stable across older age groups as described in Lindau's study (Lindau et al., 2008) but increased with the severity of cervical lesions, which is in line with data reported by Chiang et al. among Taiwanese women (Chiang et al., 2013). Among the specific HPV genotypes, HPV 16 was the most prevalent (23.8%) as reported by Zietkowiak et al. in women aged 56 to 78 years (26%) (Zietkowiak et al., 2002) and Baay et al. in women older than 65 (35.3%) (Baay et al., 2004). The frequency of HPV 16 increased with lesion severity, as also noted by Chiang et al. (Chiang et al., 2013), and confirms its



Fig. 1. Follow-up of French elderly women with a normal smear on a mean period of 29 months. NILM: Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, HPV: Human PapillomaVirus, LSIL: Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL: High Grade SIL.

distribution in women with or without cervical neoplastic diseases in all world regions (Clifford et al., 2006).

Strength and limitations of the FU study

The FU of women with normal smear at entry made it possible to detect incident CIN3 in 6% of HPV positive cases. This finding is comparable to Meyer's (Meyer et al., 2012) and Mandelblatt's (Mandelblatt et al., 1993) studies, that reported cases of HSIL + in women who presented a negative smear. Dinkelspiel et al. observed that 25% of women older than 65 with cervical cancer have had three previous consecutive negative smears (Dinkelspiel et al., 2012). Consequently, negative cytological screening is not sufficient to prevent cancer because the low risk period after several negative results does not stretch indefinitely. On the other hand, we demonstrate a beneficial effect of HPV testing. Indeed, in the population of women with normal cytology, those who developed CIN3 were HPV16 positive indicating the potential value of partial genotyping even in elderly women. This study had limitations: less than 15% of women with NILM and HPV negative were followed up and the duration of the follow up was short.

Cancer screening decisions in older patients should estimate life expectancy and weigh potential benefits and harms according to patient's characteristics and preferences (Rustagi et al., 2013; Walter and Covinsky, 2001). A study evaluating older women's preferences regarding their screening revealed that the majority of them were willing to use a HPV test to make decisions about the frequency and duration of cervical cancer screening (Huang et al., 2008). As discussed by Castañón et al., since the long term NPV of HPV testing is better than that of cytology one would expect the period of low risk to be longer following an HPV test, but no current study is looking at the risk 15–20 y after a negative HPV test (Castanon et al., 2014).

Conclusion

According to our overall results, it is essential to pay particular attention to hospital Gynecology Clinic attendees aged over 65, emphasizing the importance of HPV counseling, screening decisions and healthrelated quality of life. A conceptual framework based on individual patient characteristics and wishes to guide cancer screening decisions in older women may be more useful to practicing clinicians than age guidelines.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx. doi.org/10.1016/j.ypmed.2015.08.018.

Author contributions

Conceived and designed the study: CM, JLP, and DG. Helped to recruit the patients and collect the samples analyzed: DR. Contributed to cytology/pathology analysis: SVD, IB. performed the experiments: AL, EB and SV. Analyzed the data: AL, EB, DG, SC and CM. Drafted the manuscript: AL, EB, JLP, DG and CM.

Conflict of interest

none.

Acknowledgments

The authors would like to thank pathologists, gynecologists and technicians for their collaboration in this study. We are grateful to F. Ecarnot (EA3920, University Hospital Besancon, France) for critical revision of this manuscript. We thank E.M. de Villiers (DKFZ, Heidelberg, Germany) for kindly providing us with the HPV 16, HPV 18 and HPV 45 plasmids. The grant sponsor was The Ligue Contre le Cancer (Comité du Doubs and CCIR-GE) and the Région de Franche-Comté. Mrs E. Belglaiaa is a recipient of a predoctoral scholarship from the Moroccan

Ministry of Higher Education and Scientific Research, and was also granted a Leclère- Giry scholarship from the Association Française des Femmes Diplômées des Université (AFFDU), Paris, France.

References

- American Cancer Society, 2014. Cervical Cancer Available at http://www.cancer.org/acs/ groups/cid/documents/webcontent/003094-pdf.
- Anaes, 2002. Recommendations pour la pratique clinique. Conduite à tenir devant une patiente avant un frottis cervico-utérin anormal.
- Andrae, B., Kemetli, L., Sparen, P., et al., 2008. Screening-preventable cervical cancer risks: evidence from a nationwide audit in Sweden. J. Natl. Cancer Inst. 100, 622–629.
- Arbyn, M., Castellsague, X., de Sanjose, S., et al., 2011. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. Ann. Oncol. 22, 2675–2686.
- Arbyn, M., Ronco, G., Anttila, A., et al., 2012. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. Vaccine 30 (Suppl. 5), F88–F99.
- Baay, M.F., Smits, E., Tjalma, W.A., et al., 2004. Can cervical cancer screening be stopped at 50? The prevalence of HPV in elderly women. Int. J. Cancer 108, 258–261.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., et al., 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. Rev. Epidemiol. Sante Publique 56, 159–175.
- Brun, J.L., Stoven-Camou, D., Trouette, R., Lopez, M., Chene, G., Hocke, C., 2003. Survival and prognosis of women with invasive cervical cancer according to age. Gynecol. Oncol. 91, 395–401.
- Castanon, A., Landy, R., Cuzick, J., Sasieni, P., 2014. Cervical screening at age 50–64 years and the risk of cervical cancer at age 65 years and older: population-based case control study. PLoS Med. 11, e1001585.
- Castle, P.E., Jeronimo, J., Schiffman, M., et al., 2006. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. Cancer Res. 66, 1218–1224.
- Centurioni, M.G., Puppo, A., Merlo, D.F., et al., 2005. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. BMC Infect. Dis. 5, 77.
- Chappuis, M., Antonielli, A.B., Laurence, S., Rochefort, J., Giboin, C., Corty, J.F., 2014. Cervical and breast cancer prevention among underprivileged women in France: an epidemiological study. Bull. Cancer 101, 663–668.
- Chiang, Y.C., Cheng, W.F., Chen, Y.L., et al., 2013. High-risk human papillomavirus, other than type 16/18, in predominantly older Taiwanese women with high-grade cervical preinvasive lesions. Taiwan. J. Obstet. Gynecol. 52, 222–226.
- Clifford, G., Franceschi, S., Diaz, M., Munoz, N., Villa, L.L., 2006. Chapter 3: HPV typedistribution in women with and without cervical neoplastic diseases. Vaccine 24 (Suppl. 3) (S3/26-34).
- Dalstein, V., Riethmuller, D., Sautiere, J.L., et al., 2004. Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population; benefits of testing for human papillomavirus. Eur. J. Cancer 40, 1225–1232.
- de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., et al., 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect. Dis. 7, 453–459.
- Dinkelspiel, H., Fetterman, B., Poitras, N., et al., 2012. Screening history preceding a diagnosis of cervical cancer in women age 65 and older. Gynecol. Oncol. 126, 203–206.
- DREES, 2015. Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques. L'état de santé de la population en France. Édition 2015. pp. 330–334.
- Elfstrom, K.M., Arnheim-Dahlstrom, L., von Karsa, L., Dillner, J., 2015. Cervical cancer screening in Europe: quality assurance and organisation of programmes. Eur. J. Cancer 51, 950–968.
- Elit, L., 2014. Role of cervical screening in older women. Maturitas 79, 413-420.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int. J. Cancer 127, 2893–2917.
- Franceschi, S., Herrero, R., Clifford, G.M., et al., 2006. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. Int. J. Cancer 119, 2677–2684.
- Garcia-Pineres, A.J., Hildesheim, A., Herrero, R., et al., 2006. Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. Cancer Res. 66, 11070–11076.
- Guardado-Estrada, M., Juarez-Torres, E., Roman-Bassaure, E., et al., 2014. The distribution of high-risk human papillomaviruses is different in young and old patients with cervical cancer. PLoS One 9, e109406.
- Haute Autorité de Santé, 2013. Dépistage et Prévention du cancer du col de l'utérus. Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé (EPS).
- Huang, A.J., Perez-Stable, E.J., Kim, S.E., et al., 2008. Preferences for human papillomavirus testing with routine cervical cancer screening in diverse older women. J. Gen. Intern. Med. 23, 1324–1329.
- Ioka, A., Tsukuma, H., Ajiki, W., Oshima, A., 2005. Influence of age on cervical cancer survival in Japan. Jpn. J. Clin. Oncol. 35, 464–469.
- Jacquin, E., Saunier, M., Mauny, F., Schwarz, E., Mougin, C., Pretet, J.L., 2013. Real-time duplex PCR for simultaneous HPV 16 and HPV 18 DNA quantitation. J. Virol. Methods 193, 498–502.
- Kamineni, A., Weinmann, S., Shy, K.K., Glass, A.G., Weiss, N.S., 2013. Efficacy of screening in preventing cervical cancer among older women. Cancer Causes Control 24, 1653–1660.
- Katki, H.A., Kinney, W.K., Fetterman, B., et al., 2011. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. Lancet Oncol. 12, 663–672.
- La Vecchia, C., Franceschi, S., Decarli, A., Fasoli, M., Gentile, A., Tognoni, G., 1984. "Pap" smear and the risk of cervical neoplasia: quantitative estimates from a case–control study. Lancet 2, 779–782.

- Laurendeau, I., Bahuau, M., Vodovar, N., et al., 1999. TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. Clin. Chem. 45, 982–986.
- Leinonen, M.K., Nieminen, P., Lonnberg, S., et al., 2012. Detection rates of precancerous and cancerous cervical lesions within one screening round of primary human papillomavirus DNA testing: prospective randomised trial in Finland. BMJ 345, e7789.
- Lindau, S.T., Drum, M.L., Gaumer, E., Surawska, H., Jordan, J.A., 2008. Prevalence of highrisk human papillomavirus among older women. Obstet. Gynecol. 112, 979–989.
- Mandelblatt, J., Traxler, M., Lakin, P., et al., 1993. Breast and cervical cancer screening of poor, elderly, black women: clinical results and implications. Harlem Study Team. Am. I. Prev. Med. 9, 133–138.
- Mayrand, M.H., Duarte-Franco, E., Rodrigues, I., et al., 2007. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. N. Engl. J. Med. 357, 1579–1588.
- Meyer, R., Lemay, A.L., Guy, X., Giraud, C., Mathevet, P., Flori, M., 2012. Is there a benefit to continue pap smear screening for cervical cancer after 65 years of age? A retrospective study on 53,644 women. Bull. Cancer 99, 409–415.
- Monsonego, J., Cox, J.T., Behrens, C., et al., 2015. Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large U.S. screening population: data from the ATHENA trial. Gynecol. Oncol. 137, 47–54.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., et al., 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N. Engl. J. Med. 348, 518–527.
- Ogilvie, G.S., Krajden, M., van Niekerk, D.J., et al., 2012. Primary cervical cancer screening with HPV testing compared with liquid-based cytology: results of round 1 of a randomised controlled trial – the HPV FOCAL Study. Br. J. Cancer 107, 1917–1924.
- Pretet, J.L., Jacquard, A.C., Carcopino, X., et al., 2008. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. Int. J. Cancer 122, 428–432.
- Quinn, M., Babb, P., Jones, J., Allen, E., 1999. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. BMI 318, 904–908.
- Riethmuller, D., Pretet, J.L., Mougin, C., 2013. Comment surveiller un test hr-HPV positif?, Mises à jour en gynécologie médicale. – Trente-septièmes Journées nationales du CNGOF, Paris. pp. 625–635.
- Rijkaart, D.C., Berkhof, J., Rozendaal, L., et al., 2012. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. Lancet Oncol. 13, 78–88.
- Ronco, G., Dillner, J., Elfstrom, K.M., et al., 2014. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. Lancet 383, 524–532.

- Rustagi, A.S., Kamineni, A., Weiss, N.S., 2013. Point: cervical cancer screening guidelines should consider observational data on screening efficacy in older women. Am. J. Epidemiol. 178, 1020–1022.
- Saraiya, M., Benard, V.B., Greek, A.A., et al., 2014. Type-specific HPV and Pap test results among low-income, underserved women: providing insights into management strategies. Am. J. Obstet. Gynecol. 211 (354), e351–e356.
- Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H.W., et al., 2012. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. CA Cancer J. Clin. 62, 147–172.
- Schiffman, M.H., Bauer, H.M., Hoover, R.N., et al., 1993. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. J. Natl. Cancer Inst. 85, 958–964.
- Sellors, J.W., Karwalajtys, T.L., Kaczorowski, J.A., et al., 2002. Prevalence of infection with carcinogenic human papillomavirus among older women. CMAJ 167, 871–873.
- Sirovich, B.E., Gottlieb, D.J., Fisher, E.S., 2003. The burden of prevention: downstream consequences of Pap smear testing in the elderly. J. Med. Screen. 10, 189–195.
- Spayne, J., Ackerman, I., Milosevic, M., Seidenfeld, A., Covens, A., Paszat, L., 2008. Invasive cervical cancer: a failure of screening. Eur. J. Pub. Health 18, 162–165.
- Spence, A.R., Goggin, P., Franco, E.L., 2007. Process of care failures in invasive cervical cancer: systematic review and meta-analysis. Prev. Med. 45, 93–106.
- van Oortmarssen, G.J., Habbema, J.D., 1991. Epidemiological evidence for age-dependent regression of pre-invasive cervical cancer. Br. J. Cancer 64, 559–565.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., et al., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol. 189, 12–19.
- Wallin, K.L., Wiklund, F., Angstrom, T., et al., 1999. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. N. Engl. J. Med. 341, 1633–1638.
- Walter, L.C., Covinsky, K.E., 2001. Cancer screening in elderly patients: a framework for individualized decision making. JAMA 285, 2750–2756.
- Wright, J.D., Gibb, R.K., Geevarghese, S., et al., 2005. Cervical carcinoma in the elderly: an analysis of patterns of care and outcome. Cancer 103, 85–91.
- Wright, T.C., Stoler, M.H., Behrens, C.M., Sharma, A., Zhang, G., Wright, T.L., 2015. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. Gynecol. Oncol. 136, 189–197.
- Zietkowiak, W., Zimna, K., Sroka, L., Uchman, P., Sajdak, S., 2002. Frequency of HPV infection of the uterine cervix among perimenopausal women in Wielkopolska Region. Ginekol. Pol. 73, 939–944.

Rapalogs Efficacy Relies on the Modulation of Antitumor T-cell Immunity

Laurent Beziaud^{1,2}, Laura Mansi^{1,2,3}, Patrice Ravel⁴, Elodie Lauret Marie-Joseph^{1,2}, Caroline Laheurte^{1,5}, Laurie Rangan^{1,2}, Francis Bonnefoy¹, Jean-René Pallandre¹, Laura Boullerot¹, Clémentine Gamonet^{1,2}, Sindy Vrecko^{1,2}, Lise Queiroz¹, Tristan Maurina³, Guillaume Mouillet³, Thierry Nguyen Tan Hon³, Elsa Curtit^{1,2,3}, Bernard Royer^{1,6}, Béatrice Gaugler¹, Jagadeesh Bayry⁷, Eric Tartour^{8,9,10}, Antoine Thiery-Vuillemin^{1,2,3}, Xavier Pivot^{1,2,3}, Christophe Borg^{1,2,3}, Yann Godet^{1,2}, and Olivier Adotévi^{1,2,3}

Abstract

The rapalogs everolimus and temsirolimus that inhibit mTOR signaling are used as antiproliferative drugs in several cancers. Here we investigated the influence of rapalogs-mediated immune modulation on their antitumor efficacy. Studies in metastatic renal cell carcinoma patients showed that everolimus promoted high expansion of $FoxP_3^+$ Helios⁺Ki67⁺ regulatory CD4 T cells (T_{regs}). In these patients, rapalogs strongly enhanced the suppressive functions of T_{regs} , mainly in a contact-dependent manner. Paradoxically, a concurrent activation of spontaneous tumor-specific Th1 immunity also occurred. Furthermore, a high rate of Eomes⁺CD8⁺ T cells was detected in patients after a long-term mTOR inhibition. We found that early changes in the T_{regs} /antitumor Th1 balance

Introduction

mTOR protein is a conserved serine/threonine kinase involved in the regulation of cell growth, metabolism, and apoptosis (1). It exerts its physiologic functions through two distinct complexes named mTOR complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) downstream of the PI3K/AKT pathway (1). Oncogenic activation of

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

L. Beziaud and L. Mansi contributed equally to this article.

Corresponding Author: Olivier Adotévi, INSERM, UMR1098, 8, rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod, Besançon Cedex F-25020, France. Phone: 333-7063-2212; Fax: 333-7063-2431; E-mail: olivier.adotevi@univ-fcomte.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2452

©2016 American Association for Cancer Research.

can differentially shape the treatment efficacy. Patients presenting a shift toward decreased T_{regs} levels and high expansion of antitumor Th1 cells showed better clinical responses. Studies conducted in tumor-bearing mice confirmed the deleterious effect of rapalogs-induced T_{regs} via a mechanism involving the inhibition of antitumor T-cell immunity. Consequently, the combination of temsirolimus plus CCR4 antagonist, a receptor highly expressed on rapalogs-exposed T_{regs} , was more effective than monotherapy. Altogether, our results describe for the first time a dual impact of host adaptive antitumor T-cell immunity on the clinical effectiveness of rapalogs and prompt their association with immunotherapies. *Cancer Res*; 76(14); 4100–12. ©2016 AACR.

mTOR signaling induces several processes required for the growth, survival, and proliferation of cancer cells (2). Thus, mTOR inhibition has gained great interest in cancer therapy and many rapamycin analogs (rapalogs) are now being used in clinical settings (3). Everolimus and temsirolimus are two rapalogs approved for breast cancer, neuroendocrine carcinoma treatments, and relapsing metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients (4–7).

mTOR also represents a key regulator of immune responses. Notably, this pathway is determinant for the differentiation, homeostasis, and functional regulation of both CD4 and CD8 T-cell subsets (8). The lack of mTOR in naïve CD4 T cells has been shown to promote preferentially forkhead box transcription factor $(FoxP_3^+)$ regulatory T cells (T_{regs}) to the detriment of Th1, Th2, or Th17 differentiation (9, 10). In solid organ transplantation, rapalogs promote Tregs induction and create an immunosuppressive environment required to prevent from graft rejection (11, 12). Interestingly, it has been recently reported that organ transplant recipients treated with rapalogs have a lower risk of developing cancer, suggesting an impact of mTOR inhibition on antitumor immune responses (13). Indeed, recent immunologic studies showed that blocking mTOR signaling can also promote memory T-cell functions and tumor immunity in animal models (14–16). However, the rapalogs-mediated modulation of antitumor T-cell immunity and its impact on treatment efficacy have not been investigated in patients with cancer.

On the basis of the critical role played by adaptive T-cell immunity in cancer (17, 18), we hypothesized that anticancer rapalogs could promote suppressive T_{regs} , which in turn could



¹INSERM UMR1098, TIMC LabEx LipSTIC, Besançon, France. ²University of Bourgogne Franche-Comté, UMR1098, Besançon, France. ³Department of Medical Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon, France. ⁴IRCM - INSERM UI194, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Equipe Bioinformatique et Biologie des Systèmes du Cancer, Montpellier, France. ⁵EFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, INSERM CIC1431, Besançon, France. ⁶Department of Pharmacology, University Hospital of Besançon, Besançon, France. ⁷INSERM UI138, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris Descartes, Paris, France. ⁸INSERM UMR970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France. ⁹Department of Biological Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France. ¹⁰University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

be detrimental for host antitumor T-cell immunity. In this regard, we recently described a striking modulation of T-cell responses in a mRCC patient treated with everolimus (19). This patient presented at the time of disease control a strong antitumor Th1 response, which was completely lost upon disease progression when high T_{regs} expansion occurred.

Here, we studied the modulation of both T_{regs} and antitumor T-cell responses in a cohort of mRCC patients treated with everolimus. The influence of immune modulation on treatment efficacy was investigated in our cohort and confirmed in mouse tumor models.

Patients and Methods

Patients and sample collections

mRCC patients treated with everolimus were enrolled after the signature of informed consent at the University Hospital Minjoz (Besançon, France) between November 2011 and January 2015. Everolimus was administrated 10 mg daily, or 5 mg daily when occurrence of adverse events. Blood samples were collected at baseline and every 2 months. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradient (Sigma-Aldrich) and frozen until use. Disease was classified as defined by Heng and colleagues (20) and evaluation of response was performed according to RECIST.

Monitoring of $T_{\rm regs}$ and telomerase-specific Th1 responses in mRCC patients

T_{regs} staining protocol is detailed in Supplementary Materials section. Samples were acquired on a FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed with the Diva or FlowJo softwares. Antitumor Th1 responses were assessed after *in vitro* stimulation of PBMC with a mixture of HLA-DR–restricted peptides derived from telomerase (TERT; 5 µg/mL) during 7 days (21, 22). The presence of specific T cells was measured by IFNγ-ELISPOT Assay (Diaclone; ref. 21). Spot-forming cells were counted using the C.T.L. Immunospot System (Cellular Technology Ltd). The number of specific T cells expressed as spot-forming cells per 10^5 cells was calculated after subtracting negative control values (background). Responses were positive when IFNγ spots number was higher than 10 and more than twice the background.

T_{regs} suppressive assay

 T_{regs} functions were evaluated in a CellTrace 5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-labeled T-cell Proliferation Assay (Invitrogen). Briefly, 5×10^5 fresh allogenic T cells from healthy donors labeled with CFSE were cocultured for 3 days at 1:2 ratio with freshly sorted T_{regs} from healthy donors or patients, or at 1:1 ratio with sorted T_{regs} from *in vitro* culture in the presence of coated anti-CD3 (2.5 µg/mL) and soluble anti-CD28 (5 µg/mL) antibodies (BD Biosciences). Cytokines production was measured by ELISA (Diaclone). Proliferation suppression assays were also performed using transwell columns (Merck Millipore) to separate 3×10^5 T_{regs} (top chambers) from $3 \times$ 10^5 allogenic T cells (bottom chambers) in the presence of soluble anti-CD3 (5 µg/mL) and anti-CD28 (5 µg/mL) antibodies (BD Biosciences).

Tumor cell lines

The murine RCC RENCA and the melanoma-B16F10 cells transfected with ovalbumin (B16-OVA) were kindly provided by

E. Tartour (INSERM U970). The murine mammary carcinoma cell line 4T1 was kindly provided by Dr. Apetoh (INSERM U866, Dijon, France). All cells were periodically authenticated by morphologic and histologic inspection, and animal grafting for assessing their ability to grow. Cells were regularly tested for mycoplasma using Myco Alert Kit (Lonza).

Mice

Female C57BL/6NCrl and BALB/cAnCrl mice, 6 to 8 weeks old, were purchased from Charles River Laboratories and housed under pathogen-free conditions. FoxP3-eGFP and DEREG transgenic mice (23) were kindly provided by Dr. Perruche (INSERM UMR1098, Besançon, France). All experimental studies were approved by the local ethics committee (#58) and the French Ministry of Higher Education and Research and were conducted in accordance with the European Union's Directive 2010/63.

Tumor challenge and treatment

BALB/cAnCrl mice were subcutaneously injected with 5 \times 10^5 RENCA or 10^5 4T1 cells in 100 µL of saline buffer in the abdominal flank or in the mammary zone, respectively. C57BL/ 6NCrl, FoxP3-eGFP, or DEREG mice were subcutaneously injected with 2×10^5 B16-OVA cells in 100 µL of saline buffer in the abdominal flank. Tumor growth was monitored every 2 to 3 days and mice were euthanized when tumor mass reached 300 mm². When tumors reach 20 mm², mice were treated either with 2 mg/kg of temsirolimus intraperitoneally every 3 days or with everolimus administrated orally everyday by gavage at 0.65 mg/kg. The rapalogs were used at concentrations based on the study of their pharmacokinetics in patients (24). Mice from control groups were injected with the solvent used to dissolve drugs. Rapamycin (Sigma-Aldrich) was administrated intraperitoneally at 75 µg/kg/day. The CCR4 antagonist (AF399/420/18 025) provided by Dr. Bayry (INSERM U872) was injected intraperitoneally at 1.5 µg/3 days.

In vivo T-cell depletion experiments

To study the implication of immune cells on the antitumor effect of rapalogs, mice were injected intraperitoneally before tumor graft then every 2 weeks with 200 μ g of monoclonal-depleting antibodies (mAb). Anti-CD4 (clone GK1.5), CD8 (2.43), and CD25 (PC61.5) antibodies or isotype controls were purchased from BioXcell. To deplete T_{regs}, mice were injected intraperitoneally twice (day –4 and day 0) before tumor graft with 250 μ g of PC61.5 mAb (BioXcell). DEREG mice were injected intraperitoneally with 80 μ g/kg of diphtheria toxin (Sigma-Aldrich) to deplete T_{regs}. Depletion efficiency was checked in the blood.

Assessment of OVA-specific T-cell responses

The ovalbumin-specific T cells were analyzed *ex vivo* in splenocytes and in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL). TILs were recovered after tumor treatment with DNAse, hyaluronidase, and collagenase (Sigma-Aldrich). The OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL, SL8) K^b-Dextramer (Immudex) staining was used to quantify OVAspecific CD8 T cells. Functionality of OVA₂₅₇₋₂₆₄-specific CD8 T cells was analyzed by IFNγ-ELISPOT on spleen-isolated CD8⁺ T cells (Miltenyi Biotec; ref. 25). For anti-OVA CD4 T-cell responses, spleen-isolated CD4⁺ T cells were cocultured in presence of

www.aacrjournals.org

dendritic cells loaded with the OVA protein (10 μ g/mL; Sigma-Aldrich) and T-cell reactivity was analyzed by IFNγ-ELISPOT. Functional analysis of CD4⁺ TILs was performed by cocultured TILs in presence of the OVA protein or of a nonantigen-specific stimulation with PMA/ionomycin. CD4⁺ TILs reactivity was evaluated by using intracytoplasmic IFNγ staining.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. Statistical comparison between groups was based on Student *t* test using Prism 6 GraphPad Software. *P* values lower than 0.05 (*) were considered significant. Data cutoff for survival analysis was January 7, 2015. To determine the impact of the everolimus-mediated immune modulation on survival, we used a model based on the normalized variation after 2 months of both immune variables T_{reg} (ΔT_{reg}) and anti-TERT Th1 (Δ anti-TERT Th1; Supplementary Materials section). Mice and patients' survival was estimated using the Kaplan–Meier method. The log-rank tests were used to compare survival distribution. The exponential regression model was used to fit the experimental data of the tumor growth (Supplementary Materials section).

Results

Everolimus treatment promotes expansion of highly suppressive FoxP₃⁺ T_{regs} in mRCC patients

A prospective immunomonitoring study was conducted in 23 mRCC patients treated with everolimus. The patients' main characteristics are depicted in Supplementary Table S1. The monitoring of FoxP₃⁺ T_{regs} was performed within blood at baseline and every 2 months (Supplementary Fig. S1). We observed that both percentage and absolute number of Tregs gradually increased (at least >20%) after treatment in 21 of 23 patients (91.3%) compared with baseline (Fig. 1A and B; 3.5% vs. 6.5%, P = 0.0002 and 46 vs. 75 \times 10 $^{6}\,\mathrm{T_{regs}}/\mathrm{L}$, P = 0.0006, respectively, between baseline and 6 months). In 7 patients, a first drop of T_{regs} levels was observed before a subsequent increase. Tregs presented the phenotype of natural T_{regs} (nT_{regs}): CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP₃⁺Helios⁺ (26) and expressed CTLA-4 and ICOS (Fig. 1C). Furthermore, a higher expression of Ki67 in T_{regs} was detected after everolimus treatment, suggesting a proliferation of this population in vivo (Fig. 1D). The analysis of total blood lymphocytes showed a relative stability of these cells during treatment; however, an increase of total CD4⁺ T cells was observed, which could be associated to Tregs expansion (Supplementary Fig. S2).

 $T_{\rm regs}$ function of the patients was then evaluated by analyzing their ability to inhibit allogenic T-cell proliferation *in vitro*. As compared with $T_{\rm regs}$ of healthy donors, sorted $T_{\rm regs}$ of patients exerted a higher inhibition of T-cell proliferation. Interestingly, inhibition of T-cell proliferation was greatly increased in presence of $T_{\rm regs}$ isolated after everolimus as compared with the baseline (Fig. 1E and F). These results showed that everolimus promotes expansion of highly suppressive $T_{\rm regs}$ in mRCC patients.

Rapalogs-exposed T_{regs} mediate contact-dependent T-cell suppression *in vitro*

To confirm the ability of rapalogs to promote highly functional $T_{regs'}$ we isolated T_{regs} from PBMCs of healthy donors cultured 10 days in presence or absence of everolimus or temsirolimus (Fig 2A). We showed that rapalogs effectively blocked the phosphorylation of S6 ribosomal protein (ser235) but not Akt (ser473), the downstream targets of mTORC1 and mTORC2, respectively (Fig. 2B and C).

As compared with nonexposed Tregs, rapalogs-exposed Tregs strongly inhibited allogenic T-cell proliferation (Fig. 2D and E) and decreased the effector cell production of IL2 and IFNy (Fig. 2F). To further dissect how rapalogs-exposed T_{regs} exerted their suppressive activity, we first measured the inhibitory cytokines IL10 and TGFB1 in the supernatants from T-cell suppressive assays. No significant production of these cytokines was observed (not shown). Although these Tregs highly expressed CTLA-4, ICOS, GITR, CD39, and CCR4 (Fig. 2G), the addition of blocking antibodies against these membrane receptors during T-cell stimulation did not affect the suppressive functions of these T_{regs} (not shown). Finally, we performed the same suppressive assays as before but using a transwell between rapalogs-exposed T_{regs} and effector T cells. As shown in Fig. 2H and I, the inhibition of T-cell proliferation was radically impaired when Trees were separated from stimulated allogenic T cells. Similarly, the production of IL2 and IFN γ was totally recovered in absence of T_{regs}-T-cell contact (Fig. 2J). Thus, rapalogs-exposed T_{regs} preferentially exert inhibitory activity in a cell contact-dependent manner.

Increase of spontaneous TERT-specific Th1 response and Eomes⁺ CD8 T cells after everolimus treatment

Concurrent to T_{regs} monitoring, the spontaneous tumor-specific Th1 response was evaluated in this cohort. To this end, we performed an IFN γ -ELISPOT to measure the lymphocytes reactivity of patients to TERT, a shared tumor antigen overexpressed in RCC (19, 27). At baseline, 11 of 23 patients' PBMCs (47.8%) demonstrated a spontaneous anti-TERT Th1 response and this frequency was increased to 17 of 23 patients (73.9%) 2 months after the beginning of treatment, suggesting the *de novo* activation of anti-TERT Th1 cells in 6 patients (Fig. 3A). Furthermore, we showed that the magnitude of this response was generally higher after treatment (42 vs. 105 anti-TERT IFN γ spots/10⁵ cells, *P* = 0.01; Fig. 3B). Thus, everolimus treatment favored a higher tumor-specific Th1 immunity.

We further assessed whether the respective subpopulations of naïve (T_{NAIVE}: CD8⁺CD45RO⁻CD62L⁺CD127⁺), central $(T_{CM}: CD8^+CD45RO^+CD62L^+CD127^+)$ or effector memory $(T_{EM}: CD8^+CD45RO^+CD62L^-CD127^+)$ CD8 T cells were also impacted by everolimus treatment (Supplementary Fig. S1). No significant modulation was observed prior and after treatment (Fig. 3C). Furthermore, we analyzed the expression of the transcription factor Eomesodermin (Eomes), a key driver of memory T-cell differentiation (28), in CD8 T cells prior and after treatment. As depicted in Fig. 3D, after a long-term everolimus exposure (> 6 months), a higher percentage of $Eomes^+CD8^+$ T cells was detected in patients. Although no modulation of CD8⁺ CD45RO⁺/CD8⁺CD45RO⁻ ratio was observed (Fig 3E), the $CD8^+CD45RO^+/T_{regs}$ ratio significantly decreased after treatment (Fig. 3F), suggesting a negative impact of T_{regs} induced following everolimus treatment on memory CD8 T cells.

Influence of immune modulation on everolimus efficacy in mRCC patients

We next addressed the effect of this immune modulation on everolimus clinical efficacy. At the time of this analysis, treatment was ongoing for 3 patients, 1 stopped for toxicity reasons and 19 patients had disease progression. At the time of disease

Immune-Mediated Antitumor Efficacy of Rapalogs



Figure 1.

Everolimus (evero) induces high immunosuppressive T_{regs} in mRCC patients. FoxP₃⁺ T_{reg} cells were monitored (n = 23). A, representative plots of T_{regs} . B, T_{regs} evolution upon everolimus; percentage (left) and absolute number (right). C, representative T_{regs} phenotype analysis. D, mean fluorescence intensity (MFI) and percentage of T_{regs} markers. E, analysis of CFSE dilution in activated CD3⁺ T cells cocultured with T_{regs} . F, percentage of inhibition of T-cell proliferation by T_{regs} (n = 4/group). *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001 (Student *t* test).

progression, the majority of patients (17/19) had a marked increase of circulating T_{regs} (Fig. 4A). This was associated with a loss of the anti-TERT Th1 responses (10/13; Fig. 4B). Accordingly, the anti-TERT Th1/ T_{regs} ratio significantly decreased when disease progressed under everolimus treatment (Fig. 4C). The antiviral

T-cell responses measured at the same time were slightly reduced but remained present in most patients (Supplementary Fig. S3). The everolimus blood concentration (EBC) was fairly similar among patients with a median EBC of 10.3 μ g/L (range, 3.90– 53.70 μ g/L; Fig. 4D). We showed that both T_{regs} and anti-TERTTh1

www.aacrjournals.org

Beziaud et al.



Figure 2.

In vitro analysis of rapalogs-exposed T_{regs} suppressive functions. A, protocol scheme with everolimus (evero; 100 ng/mL/day) or temsirolimus (temsiro; 500 ng/mL/3 days). After 24 hours of rapalogs exposure, PBMCs were stimulated for 30 minutes with anti-CD3 (5 μ g/mL) and anti-CD28 (5 μ g/mL) and assessed for pS6 (mTORC1; B) expression by phospho-flow cytometry and pAkt Ser473 (mTORC2; C) expression by Western blotting. D, CFSE dilution in activated CD3⁺ T cells cocultured with rapalogs-exposed T_{regs}. Results from one representative donor. E, percentage of inhibition of T-cell proliferation by T_{regs} in transwell assay. Results from one representative donor. I, percentage of inhibition of T-cell proliferation by T_{regs} (n = 3). J, IL2 and IFN γ production (n = 5). *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001 (Student *t* test).

Cancer Research

Immune-Mediated Antitumor Efficacy of Rapalogs



Figure 3.

Monitoring of anti-TERT Th1 cells and CD8 T cells in mRCC patients treated with everolimus (evero). Spontaneous anti-TERT Th1 and CD8 T cells were monitored (n = 23). A, frequency of patients with spontaneous anti-TERT Th1 response. B, representative IFN γ spots wells (left) and number of IFN γ -producing anti-TERT Th1 cells (right). C, percentage of naïve (T_{NAIVE} : CD8⁺CD45RO⁻CD62L⁺CD127⁺), central (T_{CM} : CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁺CD127⁺), and effector memory (T_{EM} : CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁻CD127⁺) CD8 T cells. D, representative plots of CD8⁺Eomes⁺ T cells (left) and CD8⁺Eomes⁺ evolution (right). CD8⁺CD45RO⁺/CD8⁺CD45RO⁻ T (E) cells and CD8⁺CD45RO⁺ (F) T cells/ T_{regs} ratio evolution. *, P < 0.05; **, P < 0.01 (Student *t* test). ns, not significant.

cells modulation were not directly influenced by EBC (Fig. 4E). This minimized a potential role of differential drug exposure.

To investigate the influence of the immune modulation on survival, we used a model taking into account the early variation (between baseline and 2 months) of both T_{regs} and anti-TERTTh1

cells to classify patients into three immune groups (Fig. 4F). In patients belonging to group 1 (Δ^{pos}), T_{regs} and anti-TERTTh1 cells evolved toward the same direction (growth or decline; n = 6). Group 2 (Δ^{null}) represents patients for whom the two immune parameters are rather stable through time or that the T_{regs} or

www.aacrjournals.org

Cancer Res; 76(14) July 15, 2016 4105

Beziaud et al.



Figure 4.

Influence of immune modulation on patients' survival. T_{regs} (A) and anti-TERT Th1 (B) cells variations. C, anti-TERT Th1/ T_{regs} ratio upon everolimus. D, EBC weighted to posology. E, correlation between EBC and T_{regs} (left) or IFN γ -producing anti-TERT Th1 cells (right) at week 2 and month 2 of treatment. Patients (n = 21) are classified into three immune groups according to their early (between baseline and 2 months) variation rate of T_{regs} and anti-TERT Th1 response. F, patients' distribution in each group. Symbols represent individual patient. G, Kaplan-Meier curves for progression-free survival (PFS; log-rank test). **, P < 0.01 (Student *t* test).

4106 Cancer Res; 76(14) July 15, 2016

Cancer Research

anti-TERT Th1 variation was insignificant (n = 11). In the third group (Δ^{neg}), the T_{regs} values of all patients (n = 4) decreased, whereas the anti-TERT Th1 values greatly increased. The patients belonging to the group 3 showed a longer progression-free survival (PFS; 13.2 months) than in the others groups (4.1 and 8 months for group 1 and group 2, respectively, P = 0.02; Fig. 4G). However, this early immune modulation had no significant impact on overall survival (not shown). Similar results were observed when immune parameters were calculated by taking into account the possible fluctuations in the total lymphocytes count into a distribution in two instead of three groups (Supplementary Fig. S4). Similar observations supporting these results were noticed in patients with neuroendocrine tumors treated with everolimus, in whom the survival correlated with a T_{regs} /anti-TERT Th1 modulation (Supplementary Fig. S4).

Likewise, when focusing on CD8⁺ T cells, an increase of memory CD8⁺ T cells was observed in mRCC patients belonging to the group 3 (where T_{regs} decreased early after treatment) as compared with the two other groups (Supplementary Fig. S5). Thus, a shift toward T_{regs} decrease and high expansion of antitumor Th1 immunity improves the everolimus treatment effectiveness.

T-cell subsets depletion differentially shapes the antitumor effect of rapalogs *in vivo*

To analyze more extensively the role of T cells during rapalogs treatment, we performed in vivo T-cell depletion experiments in B16-OVA-bearing mice treated with rapalogs. We showed that CD8 T-cell depletion significantly reduced the antitumor efficacy of temsirolimus or everolimus against B16-OVA (P < 0.05; Fig. 5A). In contrast to CD8 depletion, a strong inhibition of B16-OVA growth was observed in mice lacking CD4 T cells before rapalogs administration (P <0.001; Fig. 5B). Furthermore, a loss of rapamycin or temsirolimus efficacy was showed in B16-OVA-bearing mice when both T-cell subsets were removed together (Supplementary Fig S6). Similar experiments were also performed in renal carcinoma RENCA and mammary carcinoma 4T1 models. However, the depletion of T cells in these models had a low impact on treatment efficacy (Supplementary Fig. S6). The results in B16-OVA model supposed a deleterious effect of CD4 T cells especially T_{regs} during rapalogs treatment. So we assessed whether these drugs could promote T_{regs} expansion in B16-OVA-bearing mice. An early decrease of blood T_{regs} levels was observed in half rapalog-treated mice corresponding to what was observed in patients (Fig. 5C). However, a nonsignificant increase of T_{regs} in spleen and tumor was observed (Fig. 5D). As tumor growth naturally induces Tregs, we estimated the Tregs /tumor size ratio and showed that this ratio was highly increased in mice after treatment, both in tumor and spleen (Fig. 5E). Thus, like in human, rapalogs treatment promotes T_{regs} induction in tumor-bearing mice.

The presence of T_{regs} *in vivo* altered the efficacy of rapalogs via the inhibition of antitumor T-cell immunity

To study the role exerted by T_{regs} during rapalogs treatment in the B16-OVA tumor model, we used DEREG mice, which allow to selectively deplete T_{regs} after injection of diphtheria toxin (Fig. 6A). A strong tumor regression occurred in mice treated with temsirolimus followed by diphtheria toxin injection. This regression occurred at day 30, corresponding to T_{regs} elimination *in vivo* 5 days after toxin injection (Fig. 6B and C). This temporary T_{regs} depletion significantly increased the survival of mice treated with temsirolimus as compared with control mice (Fig. 6D).

Furthermore, we showed that T_{regs} ablation during temsirolimus treatment induced a higher expansion of functional anti-OVA CD8 T cells in the spleen and the tumor (Fig. 6E and F). This was also associated with the stimulation of potent IFNy-producing anti-OVA CD4 T cells in mice (Fig. 6G-I). These results suggest that the rapalogs-induced Tregs abrogate antitumor T-cell functions in vivo. Accordingly, we evaluated in vivo the combination of rapalogs with the rapeutic agents that deplete $T_{\rm regs}$ or block their suppressive functions (29). First, we showed that the anti-CD25 mAb (clone PC61.5; ref. 30) used to deplete T_{regs} in B16-OVAbearing mice prior to everolimus treatment induced a stronger inhibition of tumor growth than everolimus alone (Fig. 7A and B). Because high level of CCR4 expression was found on rapalogsexposed T_{regs} (Fig. 2G), we next combined temsirolimus with CCR4 antagonist, a competitive class of T_{reg} inhibitor (25). As depicted in Fig. 7C and D, this association efficiently delayed the B16-OVA growth and increased mice survival. Furthermore, mice treated with the temsirolimus plus CCR4 antagonist showed a significant decrease of Tregs associated with a high number of anti-OVA CD8 T cells within the TILs (Fig. 7E and F). Altogether, these results highlighted the interest to combine T_{regs} inhibition with anticancer rapalogs.

Discussion

The rapalogs everolimus and temsirolimus are two mTOR inhibitors approved as antiproliferative drugs in several cancers such as RCC (4, 5). On the basis of the critical role of mTOR on T-cell activation, the same drugs are also used in organ transplantation as immune suppressor agents (31). In this study, we reported that anticancer rapalogs induce striking modulation of host antitumor T-cell immunity, which in turn shapes the treatment efficacy.

We showed that everolimus promotes an expansion of FoxP_3^+ T_{regs} in mRCC patients. This T_{regs} increase started mostly 2 months after the beginning of treatment and remained high in most patients. T_{regs} induced after everolimus were Helios⁺, suggesting that they arise from the nT_{reg} pool and proliferated *in vivo* according to the Ki67 expression (26, 32). Furthermore, everolimus exposure strongly increases patients' T_{regs} suppressive functions. Indeed, rapalogs-exposed T_{regs} highly suppress allogenic T-cell proliferation and Th1 cytokines production *in vitro*. Although the precise mechanism of suppression required future investigations, rapalogs-exposed T_{regs} preferentially exerted a cellcontact immunosuppression as also described for nT_{regs} (26).

Very few studies have investigated the modulation and function of T_{regs} in cancer patients treated with rapalogs. A preliminary study reported a significant increase of $FoxP_3^+ T_{regs}$ in 7 mRCC patients treated with temsirolimus (33). One previous study did not find any modulation of T_{regs} after rapalog treatment but T_{regs} were monitored only once at 1 month after the beginning of treatment (34). However, an increase of T_{regs} was also reported in prostate cancer patients treated with everolimus (35). Thus, like in organ transplantation, mTOR inhibition increases T_{regs} number and their suppressive functions in cancer patients (12, 36).

The antitumor CD4 Th1 immunity was concurrently explored in mRCC patients. To this end, we tested the reactivity of patients'

www.aacrjournals.org

Beziaud et al.



Figure 5.

In vivo T-cell depletion impacts on rapalogs treatment efficacy. B16-OVAbearing C57BL/6 mice (n = 5/group) depleted with anti-CD8 (A) or anti-CD4 (B) mAbs injections were treated with rapalogs. Control mice received solvent and isotype control mAb. Tumor growth rate are shown. The symbols represent the evolution of mean \pm SEM tumor size and the lines are the exponential regression model fitting the mean tumor size. C and D, $FoxP_3^+ T_{regs}$ percentage in the blood of B16-OVA-bearing mice at baseline and 7 days after the beginning of temsirolimus treatment (n = 10/group; C) and at day 25 in the spleen and tumor, representative dot plots (D). E, T_{regs}/tumor size ratio in the spleen (left) and in the tumor (right). Results represent at least three independent experiments.*, P < 0.05 (Student t test). Evero, everolimus; temsiro, temsirolimus. ns, not significant.

T cells against MHC class II-restricted peptides derived from TERT (21, 22). We showed that everolimus treatment stimulated and sustained spontaneous anti-TERT Th1 response. Furthermore, an increase in the magnitude of this response was observed after

treatment. So, dual modulations of host antitumor CD4 T-cell responses can occur during everolimus treatment. One plausible explanation of the stimulation of tumor-specific CD4 T cells may be related to the ability of mTOR inhibition to promote

Immune-Mediated Antitumor Efficacy of Rapalogs



Figure 6.

Effects of conditional T_{regs} removal during rapalogs treatment. DEREG mice (n = 4/group) were grafted with B16-OVA and then treated or not with temsirolimus (temsiro). A, diphtheria toxin injections (80 µg/kg) and example of T_{regs} depletion at sacrifice. B and C, tumor growth (B) and comparison of tumor growth rate (C). The regression model was not applicable for the group treated by temsirolimus + Diphtheria toxin (Diph tox) over the 30th day. D, Kaplan-Meier survival curves (log-rank test). E, OVA₂₅₇₋₂₆₄ K^b-dextramer staining in spleen and TILs at day 35. Representative splenocytes dot plots and percentage of OVA₂₅₇₋₂₆₄-specific CD8⁺ (F) and CD4⁺ (G) T cells measured *ex vivo* in the spleen by IFN₇-ELISPOT at day 35. H, CD4⁺ T cells reactivity was analyzed in the tumor by IFN₇ intracellular staining after OVA stimulation (H) or PMA/ionomycine stimulation with representative dot plots and percentage of IFN₇⁺ CD4⁺ TILs (I). Experiments were reproduced three times. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01 (Student *t* test).

www.aacrjournals.org

Beziaud et al.



Figure 7.

Combination of rapalogs with anti-CD25 mAb or CCR4 antagonist. FoxP3-eGFP mice (n = 5/aroup) were depleted or not with anti-CD25 mAb and then grafted with B16-OVA tumor. Tumor-bearing mice were treated or not with everolimus (0.65 mg/ kg/day). A, the symbols represent the evolution of mean \pm SEM tumor size for each group and the lines are the exponential regression model fitting the mean tumor size. Tumor growth rates were compared. B, Kaplan-Meier survival curves (log-rank test), C. B16-OVA-bearing mice were concomitantly or individually treated with temsirolimus (temsiro, Tems) and CCR4 antagonist (1.5 µg/mice) and tumor growth rates were compared. D. Kaplan-Meier survival curves (log-rank test). E and F, $FoxP_3^+$ T_{regs} staining in spleen at day 25 with representative dot plots (E) and percentage OVA₂₅₇₋₂₆₄-specific CD8⁺ TILs detected by dextramer staining at day 25 (F). n = 5 mice/group were used and experiments were reproduced two times *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01 (Student *t* test).

autophagy (37). Autophagy has been shown to be critical for the antitumor immune response elicited by dying tumor cells (38). In addition, this process improves antigen processing by MHC class II molecules (39, 40). These results also support our previous observation in one mRCC patient treated with everolimus that presented an amplification of antitumor Th1 cells followed by T_{regs} induction (19). Furthermore, mTOR inhibition has been shown to increase both the quantity and quality of memory T-cell responses (14–16).

An important issue of this study is a potential correlation between patients' survival (PFS) and immune modulation observed after everolimus treatment. At the time of disease progression under everolimus treatment, the majority of patients totally lost the anti-TERT Th1 response in favor to a marked increase of $T_{\text{regs}}.$ Accordingly, we observed a high decrease of $\text{CD8}^+\text{CD45RO}^+/\text{T}_{\text{regs}}$ and $\text{Th1}/\text{T}_{\text{regs}}$ ratio at the same time. A mathematical model based on the early variation of both T_{regs} and anti-TERT Th1 cells was used to study the relationship between immune modulation and patient's clinical outcome. Our results suggested that an early establishment of a good immune environment toward the decrease of T_{regs} and the increase of antitumor Th1 immunity may enhance everolimus clinical efficacy. However, due to the small number of patients enrolled in this study, our hypothesis deserves further confirmation in a larger cohort of mRCC patients and in other tumors.

To dissect the role of T cells during rapalogs treatment, we used various mouse tumor models. Our choice of models was based on rapalogs indications in renal and breast carcinoma (4, 5, 7) and their current evaluation in melanoma (41). In contrast with that in RENCA and 4T1 tumors, we observed that T-cell subsets can differentially shape the efficacy of rapalogs against B16-OVA tumor growth. While CD8 T-cell depletion reduces rapalogs efficacy on B16-OVA tumor growth, we showed that the removal of CD4 T cells strongly increased the antitumor effect of these drugs. The discrepancy in these tumor models may be related to the difference in the genetic background of the mice. In this regard, RENCA and 4T1 grow in Balb/c mice, a genetic background commonly known to develop a weaker Th1 response than C57BL/6 (42). Furthermore, B16-OVA was previously used in several studies to evaluate the immune responses after mTOR inhibition (43-45).

Because CD4 T-cell depletion increases rapalogs efficacy, we focused our attention on the role of T_{regs} *in vivo*. Like in patients, we showed that everolimus or temsirolimus induced T_{regs} expansion in mice and temporary depletion of these cells during rapalogs treatment in DEREG mice drastically increased treatment efficacy. Interestingly, T_{regs} ablation during rapalogs treatment promotes high expansion of both anti-OVA CD8 and CD4 T cells within the tumor supporting an inhibitory effect of rapalogs-exposed T_{regs} on antitumor T cells *in vivo*. Similar data

Immune-Mediated Antitumor Efficacy of Rapalogs

have recently reported by Wang and colleagues, using a RENCA expressing CA9 as tumor antigen in Balb/C mice (46). These observations led us to combine rapalogs with strategies that block T_{reg} cells *in vivo* (29). Then we found that rapalogs efficacy was highly improved by combining with an antagonist of CCR4, a CCL17 and CCL22 chemokines receptor (47) highly expressed on rapalog-exposed T_{regs} . This association also promotes a high expansion of anti-OVA CD8⁺ TILs.

In conclusion, this study clearly indicates that anticancer rapalogs shape the host antitumor T-cell immunity and thereby affect patients' clinical outcome. Because RCC is an immunogenic tumor and is known to respond to immunotherapies (48, 49), we believed that there is strong rational to combine rapalogs with T_{regs} or immune checkpoint blockade to shift host immune responses toward protective antitumor immunity.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

J. Bayry has ownership interest (including patents) in US patent 20110171261 and WO/2009/150433 for CCR4 antagonists. A. Thierry-Vuillemin is a consultant/advisory board member for Novartis and Pfizer. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: L. Mansi, E. Curtit, B. Gaugler, X. Pivot, O. Adotévi Development of methodology: L. Beziaud, F. Bonnefoy, J.-R. Pallandre, L. Queiroz, J. Bayry, O. Adotévi

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): L. Beziaud, L. Mansi, E. Lauret Marie-Joseph, C.

References

- Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell 2012;149:274–93.
- Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. Nature 2006;441:424–30.
- 3. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. Front Oncol 2014;4:64.
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2007;356:2271–81.
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. Lancet 2008;372:449–56.
- Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med 2011;364:514–23.
- Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 2012;366:520–9.
- 8. Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. Nat Rev Immunol 2012;12:325–38.
- Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, Heikamp E, Meyers DJ, Horton MR, et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. Nat Immunol 2011;12:295–303.
- Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, Xiao B, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. Immunity 2009;30:832–44.
- 11. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo M-G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. Blood 2005;105:4743-8.
- 12. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. J Am Soc Nephrol 2007;18:1007–18.
- Jung J-W, Overgaard NH, Burke MT, Isbel N, Frazer IH, Simpson F, et al. Does the nature of residual immune function explain the differential risk of non-melanoma skin cancer development in immunosuppressed organ transplant recipients? Int J Cancer 2016;138:281–92.

Laheurte, L. Rangan, F. Bonnefoy, J.-R. Pallandre, L. Boullerot, C. Gamonet, S. Vrecko, L. Queiroz, T. Nguyen Tan Hon, E. Curtit, B. Royer, A. Thiery-Vuillemin Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): L. Beziaud, L. Mansi, P. Ravel, L. Rangan, S. Vrecko, L. Queiroz, E. Curtit, B. Royer, B. Gaugler, J. Bayry, E. Tartour, Y. Godet, O. Adotévi

Writing, review, and/or revision of the manuscript: L. Beziaud, L. Mansi, G. Mouillet, T. Nguyen Tan Hon, E. Curtit, B. Royer, B. Gaugler, E. Tartour, A. Thiery-Vuillemin, X. Pivot, Y. Godet, O. Adotévi

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): L. Beziaud, S. Vrecko, L. Queiroz, E. Curtit, J. Bayry, C. Borg, O. Adotévi

Study supervision: T. Maurina, E. Curtit, X. Pivot

Acknowledgments

The authors thank all patients and medical doctors who participated in this study. The authors also thank the Biomonitoring platform of CIC-1431 and Dr. Mossu for their technical support and Ms. Odrion, Drs. Dosset, Sandoval, and Perruche for writing assistance.

Grant Support

This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer, the University of Franche-Comté, the Conseil Régional de Franche-Comté, and the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021).

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 September 8, 2015; revised April 22, 2016; accepted April 27, 2016; published OnlineFirst May 17, 2016.

- Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. Nature 2009;460: 108–12.
- Li Q, Rao RR, Araki K, Pollizzi K, Odunsi K, Powell JD, et al. A central role for mTOR kinase in homeostatic proliferation induced CD8+ T cell memory and tumor immunity. Immunity 2011;34:541–53.
- Rao RR, Li Q, Odunsi K, Shrikant PA. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. Immunity 2010;32:67–78.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science 2011; 331:1565–70.
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer 2012; 12:298–306.
- Thiery-Vuillemin A, Laheurte C, Mansi L, Royer B, Pivot X, Borg C, et al. Immunomodulatory effects of everolimus in a long responsive patient with metastatic renal cell carcinoma. J Immunother 2014;37:51–4.
- 20. Heng DYC, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. J Clin Oncol 2009;27:5794–9.
- Godet Y, Fabre E, Dosset M, Lamuraglia M, Levionnois E, Ravel P, et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. Clin Cancer Res 2012;18: 2943–53.
- 22. Laheurte C, Galaine J, Beziaud L, Dosset M, Kerzerho J, Jacquemard C, et al. Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4⁺ Th1 responses against telomerase in cancer patients. Oncolmmunology 2016;5:e1137416.
- Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. J Exp Med 2007;204:57–63.
- 24. Thiery-Vuillemin A, Mouillet G, Nguyen Tan Hon T, Montcuquet P, Maurina T, Almotlak H, et al. Impact of everolimus blood concentration

www.aacrjournals.org

on its anti-cancer activity in patients with metastatic renal cell carcinoma. Cancer Chemother Pharmacol 2014;73:999–1007.

- Pere H, Montier Y, Bayry J, Quintin-Colonna F, Merillon N, Dransart E, et al. A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. Blood 2011;118: 4853–62.
- 26. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. Annu Rev Immunol 2012;30:733–58.
- Fan Y, Liu Z, Fang X, Ge Z, Ge N, Jia Y, et al. Differential expression of fulllength telomerase reverse transcriptase mRNA and telomerase activity between normal and malignant renal tissues. Clin Cancer Res 2005;11: 4331–7.
- 28. Knox JJ, Cosma GL, Betts MR, McLane LM. Characterization of T-bet and eomes in peripheral human immune cells. Front Immunol 2014;5:217.
- 29. Pere H, Tanchot C, Bayry J, Terme M, Taieb J, Badoual C, et al. Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer. Oncoimmunology 2012;1:326–33.
- Oldenhove G, de Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. J Exp Med 2003;198:259–66.
- Groth CG, Bäckman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. Transplantation 1999;67:1036–42.
- Elkord E, Sharma S, Burt DJ, Hawkins RE. Expanded subpopulation of FoxP3+ T regulatory cells in renal cell carcinoma co-express Helios, indicating they could be derived from natural but not induced Tregs. Clin Immunol 2011;140:218–22.
- 33. Salas RN, Ireland JL, Ko JS, Elson P, Garcia JA, Wood L, et al. Immune cell changes in the peripheral blood of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients (pts) treated with sunitinib or temsirolimus. J Clin Oncol 26:15s (suppl; abstr 5099).
- 34. Kobayashi M, Kubo T, Komatsu K, Fujisaki A, Terauchi F, Natsui S, et al. Changes in peripheral blood immune cells: their prognostic significance in metastatic renal cell carcinoma patients treated with molecular targeted therapy. Med Oncol 2013;30:556.
- Templeton AJ, Dutoit V, Cathomas R, Rothermundt C, Bärtschi D, Dröge C, et al. Phase 2 trial of single-agent everolimus in chemotherapy-naive patients with castration-resistant prostate cancer (SAKK 08/08). Eur Urol 2013;64:150–8.
- 36. Bocian K, Borysowski J, Wierzbicki P, Wyzgal J, Klosowska D, Białoszewska A, et al. Rapamycin, unlike cyclosporine A, enhances suppressive functions

of *in vitro*-induced CD4+CD25+ Tregs. Nephrol Dial Transplant 2010;25: 710-7.

- Weiner LM, Lotze MT. Tumor-cell death, autophagy, and immunity. N Engl J Med 2012;366:1156–8.
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. Science 2011;334:1573–7.
- Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL, Eissa NT. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. Nat Med 2009;15:267–76.
- Münz C. Antigen processing for MHC Class II presentation via autophagy. Front Immunol 2012;3:9.
- Slingluff CL, Petroni GR, Molhoek KR, Brautigan DL, Chianese-Bullock KA, Shada AL, et al. Clinical activity and safety of combination therapy with temsirolimus and bevacizumab for advanced melanoma: a phase II trial (CTEP 7190/Mel47). Clin Cancer Res 2013;19:3611–20.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986;136: 2348–57.
- 43. Rovira J, Sabet-Baktach M, Eggenhofer E, Lantow M, Koehl GE, Schlitt HJ, et al. A color-coded reporter model to study the effect of immunosuppressants on CD8+ T-cell memory in antitumor and alloimmune responses. Transplantation 2013;95:54–62.
- Rovira J, Renner P, Sabet-Baktach M, Eggenhofer E, Koehl GE, Lantow M, et al. Cyclosporine A inhibits the T-bet-dependent antitumor response of CD8(+) T cells. Am J Transplant 2016;16:1139–47.
- Diken M, Kreiter S, Vascotto F, Selmi A, Attig S, Diekmann J, et al. mTOR inhibition improves antitumor effects of vaccination with antigen-encoding RNA. Cancer Immunol Res 2013;1:386–92.
- Wang Y, Sparwasser T, Figlin R, Kim HL. Foxp3+ T cells inhibit antitumor immune memory modulated by mTOR inhibition. Cancer Res 2014; 74:2217–28.
- Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. J Exp Med 2001;194:847–53.
- Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2015;373:1803–13.
- Inman BA, Harrison MR, George DJ. Novel immunotherapeutic strategies in development for renal cell carcinoma. Eur Urol 2013;63:881–9.





Rapalogs Efficacy Relies on the Modulation of Antitumor T-cell Immunity

Laurent Beziaud, Laura Mansi, Patrice Ravel, et al.

Cancer Res 2016;76:4100-4112. Published OnlineFirst May 17, 2016.

 Updated version
 Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2452

 Supplementary Material
 Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2016/05/14/0008-5472.CAN-15-2452.DC1

Cited articles	This article cites 47 articles, 15 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/14/4100.full#ref-list-1
E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, use this link http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/14/4100. Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.






La théorie actuelle de l'immunosurveillance des cancers établit l'existence d'un système dynamique d'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales. Plusieurs expériences majeures ont démontré l'importance du système immunitaire et en particulier des lymphocytes T dans la surveillance des cancers et dans l'efficacité des thérapies antitumorales. Certains traitements utilisés contre le cancer peuvent en effet stimuler ou inhiber la réponse immunitaire antitumorale. En plus de leur effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses ces médicaments, tel que le Sorafenib, peuvent inhiber des cellules immunosuppressives telles que les Treg et les MDSC. D'autres chimiothérapies, telle que l'Oxaliplatine, peuvent induire une mort cellulaire immunogène nécessaire à leur efficacité clinique. L'Oxaliplatine est également connue pour ajouter des groupements alkyles sur les bases puriques de l'ADN à l'origine de mutations. Parallèlement, la caractérisation de nombreuses mutations immunogènes a été menée au cours des dernières années sans que le rôle des traitements dans l'apparition de celles-ci n'ait été recherché. Les mutations spécifiques des agents alkylants correspondent à une modification des bases AG, GG et de la base en 5' de groupe AG ou GG. Ces mutations permettraient de diversifier le répertoire antigénique en créant des néoantigènes reconnus par les lymphocytes T.

L'objectif principal de ce travail a été d'identifier de nouveaux épitopes immunogènes issus d'antigènes de tumeurs en utilisant une stratégie d'immunologie inverse. La première partie a permis l'identification de trois néoépitopes immunogènes restreints par le CMH-II et potentiellement impliqués dans la rémission complète d'un patient atteint d'un hépatocarcinome métastatique traité par Sorafenib. L'immunogénicité de ces trois néoépitopes issus des protéines HELZ2, MLL2 et IL-1 β mutées a été validée après stimulation in vitro des lymphocytes T du patient. La seconde partie, portant sur l'identification de néoantigènes induits par Oxaliplatine a permis de poursuivre la caractérisation des mutations chimioinduites et d'identifier 26 néoépitopes potentiellement présentés par les CMH-I.

Ces travaux renforcent le lien entre le système immunitaire et l'efficacité des chimiothérapies. Ils suggèrent pour la première fois que les chimiothérapies pourraient augmenter l'immunogénicité des tumeurs, en augmentant le répertoire des néoantigènes.

Mots clés : Immunomodulation, Réponses lymphocytaires T antitumorales, Néoantigènes.

Abstract

The current theory of cancer immunosurveillance establishes the existence of a dynamic system of interaction between the immune system and tumor cells. Several major experiments have demonstrated the importance of the immune system and in particular T cells in cancer surveillance and the effectiveness of anti-tumor therapies. Treatments used against cancer can stimulate or inhibit the immune response to tumor. In addition to their cytotoxic effect on cancer cells, these drugs, such as Sorafenib, can inhibit immunosuppressive cells such as Treg and MDSC. Other chemotherapies, such as Oxaliplatin, can induce an immunogenic cell death required for its efficacy. Oxaliplatin is also known to add alkyl groups on the puric bases that cause DNA mutations. At the same time, the characterization of many immunogenic mutations has been carried out in recent years without evaluating the role of treatments in the appearance of such immunogenic mutations. The specific mutations of the alkylating agents correspond to a modification of the AG, GG bases and 5' base of the AG or GG motif. These mutations would diversify the antigenic repertoire by creating neoantigens recognized by T cells.

The main objective of this work was to identify new immunogenic epitopes derived from tumor antigens using a reverse immunology strategy. The first part identified three immunogenic neoepitopes restricted by MHC-II and potentially involved in the complete remission of a patient with metastatic hepatocarcinoma treated with Sorafenib. The immunogenicity of these three neoepitopes derived from mutated HELZ2, MLL2 and IL-1 β proteins was validated after in vitro stimulation of the patient's T cells. The second part, dealing with the identification of neoantigens induced by Oxaliplatin, made it possible to characterize chemoinduced mutations and to identify 26 neoepitopes potentially presented by MHC-I.

This work reinforces the link between the immune system and the effectiveness of chemotherapy. They suggest for the first time that chemotherapy could increase tumor immunogenicity by increasing the repertoire of neoantigens.

Keywords: Immunomodulation, Antitumor T cell responses, Neoantigens.