

Université de Montréal

**Identifier et cibler les meilleurs antigènes pour  
l'immunothérapie du cancer**

par Krystel Vincent

Programme de Biologie Moléculaire, option Biologie des Systèmes  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en Biologie Moléculaire  
option Biologie des Systèmes

Septembre, 2017

© Krystel Vincent, 2017

## Résumé

Dans un contexte où le transfert adoptif de lymphocytes T (ATC) représente l'avenir de l'immunothérapie du cancer, l'identification des meilleurs antigènes associés aux molécules de classe I du CMH (MAP) à cibler sur les cellules cancéreuses est d'une importance capitale. Plusieurs types de MAP sont des cibles potentielles pour l'ATC : **1)** les antigènes mineurs d'histocompatibilité (MiHA) qui dérivent de polymorphismes génétiques entre un donneur et un receveur lors d'un ATC, **2)** les antigènes associés aux tumeurs (TAA) qui peuvent dériver de transcrits surexprimés et **3)** les antigènes spécifiques aux tumeurs (TSA) qui dérivent de mutations somatiques ou de transcrits exprimés de façon aberrante. Des centaines d'essais cliniques ont mis en évidence un potentiel thérapeutique pour chacune de ces classes de MAP. Néanmoins, les ATC ciblant ces antigènes sont utilisés en contextes largement différents: des lymphocytes T MiHA-spécifiques provenant d'un donneur compatible sont utilisés pour le traitement de cancers hématologiques tandis que des lymphocytes T TAA- ou TSA-spécifiques provenant du patient sont utilisés pour traiter des tumeurs solides. De fait, jamais ces différents types de MAP n'ont été comparés pour leur potentiel thérapeutique dans un même modèle tumoral. L'objectif de cette thèse était donc de mesurer et de comparer le potentiel thérapeutique de MiHA, TAA et TSA exprimés dans la lignée cellulaire EL4 afin de mieux comprendre les mécanismes dictant leur immunogénicité. Nous avons donc sélectionné des MiHA et des TAA rapportés dans la littérature, puis avons développé une approche protéogénomique permettant d'identifier tous les types de TSA présentés sur ces cellules. Nous avons ainsi déterminé que : **1)** Seuls les MAP perçus comme du non-soi (MiHA et TSA) peuvent induire de fortes réponses anti-cancéreuses, **2)** Leur immunogénicité dépend de l'abondance et de l'avidité fonctionnelle des lymphocytes T antigène-spécifiques et **3)** La clonalité des antigènes et la nature de leurs altérations génétique dictent également l'immunogénicité des TSA. En résumé, nous avons développé une plateforme permettant l'identification de MAP présentés par les cellules cancéreuses et identifié des paramètres permettant la priorisation de ceux-ci en contexte clinique.

**Mots-clés :** Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, immunothérapie, lymphocytes T, antigènes mineurs d'histocompatibilité, antigènes associés aux tumeurs, antigènes spécifiques aux tumeurs, spectrométrie de masse, séquençage d'ARN, protéogénomique

## Abstract

In a context where adoptive transfer of T lymphocytes (ATC) represents the future of cancer immunotherapy, the identification of the best antigens associated to major histocompatibility complex class I (MAPs) to target on cancer cells is of capital importance. Several types of MAPs expressed at the surface of cancer cells can be targeted for ATC: **1)** minor histocompatibility antigens (MiHAs), that derive from germline polymorphisms between a donor and a recipient during an ATC, **2)** tumor associated antigens (TAAs) that include antigens that derive from overexpressed transcripts in cancer cells compared to their normal counterpart and **3)** tumor specific antigens (TSAs) that derive from somatic mutations or from aberrantly expressed transcripts in cancer cells. Hundreds of clinical trials have highlighted the therapeutic potential of each of these classes of antigens. Nonetheless, ATCs targeting these antigens have been studied in dramatically different contexts: donor-derived T cells targeting MiHAs are used for treating hematologic malignancies while patient-derived T cells targeting TAAs or TSAs are used for the treatment of solid tumors. As such, the therapeutic potential of these MAPs has never been assessed in a single tumor model. Thus, the goal of this thesis was to evaluate and compare the therapeutic potential of MiHAs, TAAs and TSAs expressed on the EL4 cell line to better understand the mechanisms dictating their immunogenicity. We first selected MiHAs and TAAs previously reported in the literature, then developed a proteogenomic approach that enabled us to identify all types of TSAs presented by EL4 cells. By doing so, we found that : **1)** Only MAPs that are seen as non-self by T cells (MiHAs and TSAs) can induce strong antitumor responses, **2)** Both the abundance and functional avidity of MiHA- or TSA-specific T cells dictated the immunogenicity of these antigens, and **3)** The clonality of the antigen and the nature of their genetic alterations also represented an important parameter dictating TSAs' immunogenicity. In conclusion, we developed a proteogenomic platform that will enable the identification of all types of cancer antigens and identified metrics that will guide the prioritization of MiHAs and TSAs in a clinical setting.

**Keywords** : Major histocompatibility complex class I, immunotherapy, T lymphocyte, minor histocompatibility antigens, tumor associated antigens, tumor specific antigens, mass spectrometry, RNA sequencing, proteogenomic

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xxiii
Avant-propos.....	xxv
<b>Chapitre 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>2</b>
1.1 Le système immunitaire.....	3
1.1.1 Les cellules du système immunitaire inné .....	3
1.1.2 Le système immunitaire adaptatif.....	4
1.1.3 Le cas particulier des cellules NKs.....	6
1.2 La présentation antigénique .....	7
1.2.1 Les molécules du CMH .....	7
1.2.2 Les molécules de classe I du CMH.....	8
1.2.2.1 Présentation antigénique classique de classe I.....	9
1.2.2.1 Origine des peptides présentés par les molécules du CMH I.....	11
1.2.3 Les molécules de classe II du CMH .....	12
1.2.3.1 La présentation antigénique de classe II.....	13
1.3 La reconnaissance antigénique .....	14
1.3.1 La reconnaissance antigénique en condition physiologique, un processus crucial pour l'éducation et l'homéostasie des lymphocytes T.....	14
1.3.1.1 La tolérance centrale.....	14
1.3.1.1.1 La présentation antigénique dans le cortex.....	15



1.3.1.1.2 La présentation antigénique dans la médulla .....	16
1.3.1.2 L'homéostasie des lymphocytes T naïfs en périphérie .....	18
1.3.1.3 La tolérance périphérique .....	18
1.3.2 La reconnaissance antigénique en condition pathologique : les réponses	
immunitaires de type 1 .....	20
1.3.2.1 L'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques .....	20
1.3.2.2 Les réponses immunitaires générées par les lymphocytes T .....	21
1.3.2.2.1 L'activation des lymphocytes T CD8 .....	21
1.3.2.2.2 L'aide à la réponse par les lymphocytes T CD4 .....	23
1.3.2.3 La contraction de la réponse immunitaire et la mémoire immunologique .....	25
1.3.3 La reconnaissance antigénique dans le cancer .....	27
1.3.3.1 La tolérance immunologique des cellules cancéreuses .....	28
1.3.3.2 L'épuisement des lymphocytes T .....	30
1.4 L'immunothérapie du cancer .....	31
1.4.1 Thérapies visant le microenvironnement tumoral .....	32
1.4.2 L'immuno-modulation par les anticorps monoclonaux .....	33
1.4.3 Stimulation des lymphocytes T de façon antigène spécifique .....	35
1.4.3.1 Les différents types de thérapies .....	35
1.4.3.1.1 Les lymphocytes T ayant un récepteur d'antigène chimérique .....	35
1.4.3.1.2 Stimulation <i>in vivo</i> des lymphocytes T présents dans l'environnement	
tumoral .....	37
1.4.3.1.3 Expansion <i>ex vivo</i> de lymphocytes T provenant de l'environnement	
tumoral .....	39
1.4.3.1.4 Génération de lymphocytes T ayant un TCR transgénique .....	39
1.4.3.2 Les cibles antigéniques présentées à la surface des cellules cancéreuses .....	40
1.4.3.2.1 Les antigènes mineurs d'histocompatibilité .....	40
1.4.3.2.2 Les antigènes tumoraux .....	43
1.5 Résumé et objectif de la thèse .....	48
1.6 Références .....	50

<b>Chapitre 2</b> .....	<b>75</b>
<b>2. Next-generation leukemia immunotherapy</b> .....	<b>76</b>
2.1 Mise en contexte de l'article .....	77
2.2 Contribution des auteurs .....	78
2.3 Abstract .....	79
2.4 Introduction.....	80
2.5 After conventional AHCT, GVL results from alloreactivity .....	81
2.5.1 Nature of MiHAs. ....	82
2.5.2 Do leukemia-associated Ags contribute to the GVL effect? .....	82
2.5.3 Why are T cells specific for host MiHAs more effective than LAA-specific T cells for leukemia immunotherapy? The potential role of immunoediting.....	83
2.5.4 The relation between GVHD and GVL .....	84
2.6 From conventional AHCT to Ag-specific adoptive T-cell immunotherapy.....	87
2.6.1 <i>Ex vivo</i> generation of fit MiHA- and LAA-specific T cells.....	88
2.7 MiHA-targeted ATCI of leukemia.....	90
2.7.1 GVL mediated by T cells specific for a single MiHA.....	90
2.7.2 Discovery of human MiHAs.....	91
2.7.3 Is a single Ag target sufficient for successful ATCI of leukemia? .....	92
2.8 LAA-targeted ATCI of leukemia.....	93
2.9 Targeting cell surface molecules with chimeric ag receptors (CARs) .....	95
2.10 Perspective .....	96
2.11 Acknowledgements and conflicts of interest .....	97
2.12 References.....	98
 <b>Chapitre 3</b> .....	 <b>107</b>
<b>3. Rejection of leukemic cells requires antigen-specific T cells with high functional     avidity</b> .....	<b>108</b>
3.1 Mise en contexte de l'article .....	109

3.2 Contribution des auteurs .....	110
3.3 Financial disclosure statement .....	111
3.4 Abstract .....	112
3.5 Introduction.....	113
3.6 Materials and methods .....	115
3.7 Results.....	119
3.7.1 Experimental model.....	119
3.7.2 Protective antileukemic responses can be generated by some miHAs but none of the LAAs.....	121
3.7.3 Frequency of miHA- and LAA-specific CD8 T cells in immunized mice .....	125
3.7.4 Antileukemic activity correlates with T cell functional avidity.....	125
3.7.4.1 Epitope density on EL4 cells .....	126
3.7.4.2 MHC binding affinity and stability of pMHC complexes .....	128
3.7.4.3 T cell functional avidity .....	128
3.8 Discussion.....	130
3.9 Acknowledgments and disclosure.....	133
3.10 Supplementary table and figure .....	134
3.11 References.....	136
<b>Chapitre 4 .....</b>	<b>143</b>
<b>4. Méthodes permettant l'identification d'antigènes spécifiques aux tumeurs .....</b>	<b>144</b>
4.1 Les approches d'immunologie directes .....	145
4.2 Les approches d'immunologie inversées .....	145
4.2.1 Évaluation de la probabilité de présentation de l'antigène par prédiction de son affinité pour les molécules du CMH.....	146
4.2.2 Validation de l'expression de l'antigène par sa capacité à activer des lymphocytes T.....	147
4.2.3 Validation de l'expression de l'antigène par spectrométrie de masse .....	148
4.3 Ce qu'il manque dans les analyses actuelles.....	150

4.4 Comment améliorer l'identification de peptides par MS.....	151
4.5 Références.....	153
<b>Chapitre 5 .....</b>	<b>159</b>
<b>5. Novel proteogenomic approach identifies noncanonical transcripts as a major source of tumor-specific antigens .....</b>	<b>160</b>
5.1 Mise en contexte de l'article .....	161
5.2 Contribution des auteurs .....	162
5.3 Abstract.....	163
5.4 Introduction.....	164
5.5 Methods.....	167
5.6 Results.....	175
5.6.1 When 'less is more' - building smaller MS databases to identify more TSAs.....	175
5.6.2 Identified TSAs confer different degree of protective antileukemic responses.....	182
5.6.3 T cells specific to ereTSAs are abundant in naive and immunized mice. ....	184
5.6.4 High expression of antigens at the surface of leukemic cells is necessary but not sufficient to induce antileukemic responses. ....	188
5.7 Discussion.....	190
5.8 Acknowledgments and disclosure.....	195
5.9 Supplementary Figures .....	196
5.10 Supplementary Tables.....	209
5.11 References.....	210
<b>Chapitre 6 .....</b>	<b>216</b>
<b>6. Discussion.....</b>	<b>217</b>
6.1 Le potentiel thérapeutique des MiHAs, TAAs et TSAs et les paramètres dictant leur immunogénicité .....	218
6.1.1 Seules les souris immunisées avec des antigènes perçus comme du « non-soi » sont capables d'induire des réponses immunitaires contre les cellules EL4 .....	222

6.1.2 Affinité du peptide pour les molécules du CMH.....	224
6.1.3 La fréquence des lymphocytes T antigène-spécifique.....	224
6.1.4 Expression des antigènes dans les tissus périphériques et leur clonalité.....	226
6.1.5 Effet stochastique de l'immunisation.....	230
6.1.6 La nature de l'antigène : Un facteur dictant son immunogénicité? .....	232
6.2 Quels sont les meilleurs antigènes à cibler pour l'immunothérapie du cancer? .....	234
6.2.1 Les ATC antigène-spécifiques pour le traitement des cancers hématologiques et des tumeurs solides .....	235
6.2.2 Identifier une séquence, l'appliquer à plusieurs patients? .....	236
6.2.3 Utilisation de lymphocytes T autologues ou allogéniques?.....	236
6.3 Le développement d'une approche protéomique permettant l'identification de tous les types d'antigènes.....	239
6.4 Conclusion et perspectives.....	241
6.5 Références.....	246

**Annexe I..... i**

<b>AI.1 The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation .....</b>	<b>ii</b>
AI.2 Contribution des auteurs.....	iii
AI.3 Financial disclosure statement.....	iv
AI.4 Abstract.....	v
AI.5 Introduction.....	vi
AI.6 Materials and methods.....	viii
AI.7 Results.....	xiv
AI.7.1 The effect of rapamycin on mTOR signaling in EL4 cells.....	xiv
AI.7.2 High-throughput MS-based studies unveil the plasticity of the immunopeptidome .....	xvi
AI.7.3 mTOR inhibition induces functionally coherent changes in the transcriptome and the immunopeptidome.....	xviii

AI.7.4 DEMs arise from biochemical networks connected to mTOR .....	xxii
AI.7.5 The immunopeptidome integrates events occurring at the transcriptional and co- or post-translational level.....	xxv
AI.7.6 MIPs appearing de novo on rapamycin-treated cells elicit cytotoxic T-cell responses .....	xxviii
AI.8 Discussion.....	xxx
AI.9 Acknowledgments and disclosure .....	xxxiii
AI.10 Supplementary methods.....	xxxiv
AI.10.1 Label-free quantitative proteomics approach .....	xxxiv
AI.10.2 PHP script for MHC class I peptide selection.....	xxxv
AI.11 Supplementary figures .....	xxxvii
AI.12 Supplementary tables.....	xliv
AI.13 References.....	xlviii

## Liste des tableaux

Table 2.1. Key features of different strategies for ATCI of leukemic .....	88
Table 3.1. Key features of MiHAs and LAAs .....	119
Supplementary table 3.1. Features of LAA-coding genes .....	134
Table 5.1. Characteristics of EL4-derived TSAs identified by our k-mer-based proteogenomic approach. ....	181
Supplementary Table 5.1. RNA-Seq sample metrics .....	209
Tableau 6.1. Propriétés des MiHA, TSA et TAA utilisés dans cette thèse.....	219
Tableau 6.2. Résumé des résultats des principales propriétés immunogènes évaluées .....	220
Supplementary table AI.3. GO terms enriched in DEM source genes and DEGs.....	xliv
Supplementary table AI.6. Relative expression of DEM source genes at multiple regulatory layers .....	xlvi
Supplementary table AI.7. List of primers for quantitative real-time PCR analyses .....	xlvii

## Liste des figures

Figure 1.1. Structure des récepteurs immatures et matures de cellules B et de cellules T. ....	5
Figure 1.2. Caractéristiques structurales des protéines du CMH de classe I et du CMH de classe II et le chargement de leurs peptides apprêtés par leurs compartiments respectifs. ....	9
Figure 1.3. Schématisation générale du développement des lymphocytes T dans le thymus. .	16
Figure 1.4. Le récepteur et les molécules co-stimulatrices d'activation ou d'inhibition des lymphocytes T.....	23
Figure 1.5. L'aide des lymphocytes T CD4 aux lymphocytes T CD8.....	24
Figure 1.6. Schématisation de la différenciation des lymphocytes T mémoires circulants ou résidents dans les tissus.....	26
Figure 1.7. Les mécanismes acquis de tolérance immunologique par les cellules cancéreuses.....	29
Figure 1.8. Comparaison de la structure des récepteurs de lymphocyte T générés par ingénierie et des récepteurs d'antigène chimérique.....	36
Figure 1.9. Reconnaissance des MiHA par les lymphocytes T et leur rôles dans la GVHD et la GVT.....	42
Figure 1.10. Différentes classes d'antigènes tumoraux peuvent être reconnus par les lymphocytes T et les mécanismes menant à leur génération.....	44
Figure 2.1. Schematic working model for the relation between susceptibility to alloreactive T cells and GVHD and GVL.....	85
Figure 3.1. LAAs and MiHAs are immunogenic and bind to a single MHC class I allotype.....	120
Figure 3.2. Mice immunized against MiHAs are more resistant to EL4 cells than mice immunized against LAAs.....	122
Figure 3.3. Frequency of Ag-specific CD8 T cells in primed mice.....	123
Figure 3.4. The frequency of Ag-specific CD8 T cells in immunized mice correlates with survival.....	124
Figure 3.5. Epitope stability and abundance on EL4 cells do not correlate with Ag potency.....	127
Figure 3.6. T cell functional avidity correlates with Ag potency.....	129



Supplementary Figure 3.1. Mice immunized against MiHAs survive better than mice immunized against LAAs when challenged with 50,000 EL4 cells .....	135
Figure 5.1. Identification of tumor-specific antigens from unexplored sources using a novel targeted proteogenomic workflow .....	176
Figure 5.2. EL4-derived TSAs are unlikely to be centrally tolerized .....	182
Figure 5.3. Pre-immunization with mutated and ereTSAs delays disease onset and limits leukemia outgrowth.....	184
Figure 5.4. T cells specific for ereTSAs are more frequent in the naive and immunized repertoire and are more competent than other TSA-specific T cells .....	187
Figure 5.5. High expression of EL4-derived TSAs is necessary but not sufficient to induce antileukemic responses .....	189
Supplementary Figure 5.1. Analyses pertinent to the k-mer profiling strategy.....	196
Supplementary Figure 5.2. Identified TSAs are all expected to be good MHC I binders .....	197
Supplementary Figure 5.3. MS validation of identified TSAs using synthetic analogs .....	198
Supplementary Figure 5.4. EL4-derived TSAs are unlikely to be centrally tolerized.....	203
Supplementary Figure 5.5. Detection of antigen-specific CD8 T cells in naive and pre-immunized mice .....	204
Supplementary Figure 5.6. Frequencies of antigen-specific T cells.....	206
Supplementary Figure 5.7. Correlation between antigen-specific T cell frequencies in naive and pre-immunized mice.....	207
Supplementary Figure 5.8. Correlation between antigen-specific T cell frequencies and survival of EL4-bearing mice .....	208
Figure 6.1. Arbre décisionnel pour la priorisation des antigènes en contexte thérapeutique .	242
Figure AI.1 Rapamycin differentially inhibits S6K1 versus 4E-BP1 in EL4 cells .....	xv
Figure AI.2 Rapamycin increases the abundance of MIPs presented by MHC Ia molecules .....	xvii
Figure AI.3 Rapamycin-mediated mTOR inhibition induces functionally coherent changes in the transcriptome and the immunopeptidome.....	xx
Figure AI.4 DEM source genes are tightly connected to transcriptomic changes and the mTOR network .....	xxi

Figure AI.5 DEM source genes are regulated at multiple layers within specific mTOR subnetworks .....	xxiv
Figure AI.6 Relative abundance and stability of eight DEM source proteins in the presence or absence of rapamycin .....	xxvii
Figure AI.7 Rapamycin-treated cells contain increased levels of proteasomal substrates and express antigenic MIPs .....	xxix
Supplementary figure AI.1. Rapamycin does not affect levels of proteins involved in the antigen processing and presentation pathway .....	xxxvii
Supplementary figure AI.2. Rapamycin increases the abundance of MIPs presented by MHC Ia molecules .....	xxxviii
Supplementary figure AI.3. Cellular processes enriched in the DEM source genes or the DEGs.....	xxxix
Supplementary figure AI.3 continued. Cellular processes enriched in the DEM source genes or the DEGs.....	xl
Supplementary figure AI.3 continued. Cellular processes enriched in the DEM source genes or the DEGs.....	xli
Supplementary figure AI.4. DEM source genes are involved in cellular processes and signaling events governed by the mTOR network.....	xlii
Supplementary figure AI.5. Cytotoxic activity against VNTHFSHL and KALSYASL is MHC-I restricted .....	xliii

## Liste des abréviations

4-1BBL/4-1BB; Également connu sous le nom de Ligand de / CD137  
4E-BP1; Facteur eukaryotique d'initiation de la traduction 4E

### A

AA; Acide aminés

Ab; Anticorps

ADN; Acide désoxyribonucléique

aeTSA; Antigène spécifique aux tumeurs exprimé de façon aberrante

Ag; Antigène

AHCT; Transfert adoptif de cellules hématopoïétiques

AICD; Mort cellulaire induite par l'activation

AIRE; Régulateur auto-immun

AKT; Également connu sous le nom de protéine kinase B (PKB)

AML; Leucémie Myéloïde aigue

ARN; Acide ribonucléique

ATC; Transfert adoptif de lymphocytes T

ATCI; Immunothérapie par transfert adoptif de lymphocytes T

### B

$\beta$ 2m;  $\beta$ 2-microglobuline

B10.H3b/H13b; Souris B10.LP- H3b H13b/(36NS)Sn

B10.H4b; Souris B10.129P-H46b H47b/(21M)Sn

B10.H7b; Souris B10.C-H7b/Sn

B10; Souris C57BL/10J

B6; Souris C57BL/6

B7; Protéine B7

B8R; Protéine du virus vaccinia

B-ALL; Leucémie lymphoïde aigue de type B

BCR; Récepteurs de cellules B

B-LCL; Lignée cellulaire B-lymphoblastoïde

BM; Moelle osseuse (pour bone marrow)

BTLA; Atténuateur de lymphocytes T et B

## C

CAR; Récepteur d'antigène chimérique

CD; Marqueur de surface cellulaire (pour *cluster of differentiation*)

CDP; Précurseur de cellule dendritique

CEA; Antigène carcinoembryonique

CHX; Cycloheximide

CLIP; Peptide de la chaîne invariante

CLP; Progéniteurs lymphoïdes communs

CMH; Complexe majeur d'histocompatibilité

cMoP; Précurseur commun de monocytes

CMP; Progéniteurs myéloïdes communs

CMV; Cytomégalovirus

CP; Protéasome constitutif

CTA; Antigène de cancer d'origine germinale (pour *cancer-testis antigen* ou *cancer-germline antigen*).

cTEC; Cellules épithéliales du cortex thymique

CTL; Lymphocyte T cytotoxique

CTLA-4; Antigène-4 de lymphocyte T cytotoxique

## D

DC; Cellule dendritique

DEG; Gène différentiellement exprimé

DEM; MAP différentiellement exprimé

DLI; Infusion de lymphocytes de donneurs

DN; Thymocyte double négative

DP; Thymocyte double positive

DRiPs; Produits défectueux du ribosome

## **E**

EBV; Virus d'Epstein-Barr

ER; Réticulum endoplasmique

ERAAP; Aminopeptidase du réticulum endoplasmique associée à l'apprêtement de l'antigène

ERAD : Protéine de dégradation associée au réticulum endoplasmique

ERAP1: Aminopeptidase du réticulum endoplasmique 1

ERE; Rétroéléments endogènes

ere-TSA; Antigène spécifique aux tumeurs dérivant de rétroéléments endogènes

ERp57 : Protéine du réticulum endoplasmique 57

eTAC; Cellules extrathymiques exprimant AIRE

## **F**

FasL/Fas; Également connu sous le nom de ligand de / antigène apoptotique 1 (APO-1)

Fc; Fragment cristallisable

FDA; Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*U.S. Food and Drug Administration*)

FDR; Taux de fausse découverte

FoxP3; Protéine à boîte de type tête de fourche P3

## **G**

GITR; Protéine associée au récepteur du TNF induit par les glucocorticoïdes

GM-CSF; Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

gp100; Glycoprotéine 100

gp-33; Virus de la chorioméningite lymphocytaire

GVHD; Réaction du greffon contre l'hôte

GVL/T; Réaction du greffon contre les leucémies/tumeurs

## **H**

H2; Gène du complexe majeur d'histocompatibilité murin

HA; Antigène d'histocompatibilité

HER2/Neu; Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains

HLA; Antigènes leucocytaires humains

HSC; Cellule souche hématopoïétique

HSP; Protéines de choc thermique

hTERT; Transcriptase inverse de télomérase humaine

## **I**

IDO; Indoleamine 2,3-dioxygénase

IEDB; Base de données d'épitopes immuns (pour Immune Epitope Database)

IFN; Interféron

Ig; Immunoglobuline

Ii; Chaîne invariante

IL; Interleukine

IL-R; Récepteur de l'interleukine

IL-R2 $\alpha$ ; Récepteur de l'IL-2

InDel; Insertions et/ou délétions

IP; Immunoprotéasome

## **J-K-L**

KIR; Récepteur inhibiteur tueur de type immunoglobuline

k-mers; Sous séquence de longueur k

LAG-3; Gène d'activation des lymphocytes-3

LC-MS/MS; chromatographie en phase liquide couplée à la MS/MS

LMPP; Progéniteurs lympho-myéloïdes

## **M**

M45; Protéine du cytomégalovirus murin

MAGE; Antigène du mélanome

MAP; Peptides associés aux molécules du CMH I (également nommé MIP)

MART; Antigène du mélanome reconnu par des lymphocytes T

MCS; Séquences codant pour un MAP

M-CSF; Facteur de stimulation des colonies de macrophages

MDSC; Cellules myéloïdes suppressives

MEP; Progéniteurs mégacaryocyte/érythrocyte

MiHA; Antigène mineur d'histocompatibilité  
MIIC; Compartiment du CMH de classe II  
MIP; Protéine inflammatoires des macrophages  
MMTV; Virus murin de la tumeur mammaire  
MPP; Progéniteur multipotent  
MS; Spectrométrie de masse  
mTEC; Cellules épithéliales de la médulla thymique  
mTOR; Cible de la rapamycine chez les mammifères  
mTORC1/2; Premier/Second complexe mTOR  
mTSA; Antigène spécifique aux tumeurs portant une mutation  
MUC1; Mucine 1  
MuLV; Virus de la leucémie murine

## **N**

NK; Cellules « Natural killer »  
NLR; Récepteurs de type NOD  
NOD; Récepteur du domaine d'oligomérisation des nucléotides  
NPR; ARNm polysomal normalisé  
nsSNV; Variation non-synonyme d'un seul nucléotide  
NY-ESO-1; Antigène de cancer d'origine germinale 1A (pour CTAG1A)

## **O-P**

OLS; Organes lymphoïdes secondaires  
OX-40L/OX-40; Également connu sous le nom de Ligand de/ CD134  
PAMP; Motif moléculaire associé aux pathogènes  
PAP; Phosphatase prostatique acide  
pCMH; Complexe peptide/CMH  
PCR; Réaction en chaîne par polymérase  
PD-1L/PD-1; Ligand de/Récepteur-1 de mort cellulaire programmée  
PLC; Complexe de chargement du peptide  
PP; Protéome personnalisé

PR1; Protéines de pathogénèse  
PRR; Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires  
PSA; Antigène spécifique prostatique  
PSM; Association séquence peptidique-spectre

## **Q-R-S**

RAG1/2; Gènes activant la recombinaison 1/2  
RIG-I; Protéine du gène I inductible à l'acide rétinoïque  
RLR; Récepteurs de type RIG  
RM; RepeatMasker  
ROS; Dérivés réactifs de l'oxygène  
RSS; Séquence de signal de recombinaison  
S6K1; S6 kinase 1  
Ser; Sérine  
SNP; Polymorphismes d'un seul nucléotid  
SNV; Variation d'un seul nucléotide  
s-TSA; Antigène spécifique aux tumeurs dérivant du « soi »

## **T**

TAA; Antigène associé aux cellules tumorales  
TAM; Macrophages associés aux tumeurs  
TAP-1/2; Transporteur associé à la présentation antigénique 1/2  
T-bet; Facteur de transcription à boîte T  
T-CAR; Lymphocyte T possédant un CAR  
T<sub>CM</sub>; Lymphocyte T mémoire centrale  
TCR; Récepteurs de cellules T  
TdT; Désoxynucléotidyl transférase terminale  
TEC; Cellules épithéliales thymiques  
T<sub>EFF</sub>; Lymphocyte T effecteur  
T<sub>EM</sub>; Lymphocytes T effecteur mémoires  
T<sub>H</sub>; Lymphocyte T « *helper* »



Thr; Thréonine

TIL; Lymphocyte infiltrant les tumeurs

TIM-3; Protéine de cellule T contenant un domaine immunoglobuline et mucine-3

TLR; Récepteurs de type Toll

T<sub>MEM</sub>; Lymphocytes T mémoire

TNF; Facteur de nécrose tumoral

TP; Thymoprotéasome

TPM; Transcrits par million

TRA; Antigènes d'expression restreinte aux tissus

TRAIL; Ligand induisant l'apoptose lié au TNF

T<sub>REGS</sub>; Lymphocyte T régulateur

T<sub>RM</sub>; Lymphocytes T résidents dans les muqueuses

TSA; Antigène spécifique aux cellules tumorales

T<sub>SCM</sub>; Lymphocyte T mémoire centrale de type cellule souche

TSSP; Sérine protéase spécifique du thymus

## **U-V-W-X-Y-Z**

UTR; Région non-traduite

Vcam-1; Protéine d'adhésion aux cellules vasculaires 1

VEGF; Facteur de croissance de la vasculature endothéliale

VLP; Nanoparticules de type virales

VLA-4; Antigène très tardif 4

Wt; Sauvage (pour wild-type)

WT1; Protéine de la tumeur de Wilms

*« Difficult roads often lead to beautiful destinations »*

-Melchor Lim

## Remerciements

J'aimerais débiter en remerciant mon directeur de recherche, Claude Perreault, de m'avoir transmis sa passion pour la science et sa rigueur, de m'avoir poussé à toujours donner le meilleur de moi-même, de m'avoir laissé la latitude d'explorer mes intérêts tout en me guidant et me conseillant et finalement, de m'avoir donné sa confiance durant toutes ces années.

J'aimerais également remercier mes collègues, présents et passés, pour de nombreuses discussions, certaines sérieuses et plusieurs autres, beaucoup moins! En particulier, je dois remercier Marie-Pierre, pour son soutien inestimable d'un point de vue personnel et scientifique, et sans l'aide de qui la publication de mon premier article aurait été impossible. À Céline, je tiens à dire YOLO! Nous nous sommes embarquées dans une histoire folle et parsemée d'embûches, avons passé au travers des bons et des mauvais moments, mais je ne l'aurais fait avec personne d'autre que toi. Leslie, bien que notre collaboration ait été courte, ce fut un réel plaisir d'apprendre à te connaître. Mille mercis pour tes conseils et ton aide précieuse durant la rédaction de cette thèse.

Un gros merci à tous les gens de l'IRIC qui ont contribué directement ou non au succès de nos projets, particulièrement aux gens des plateformes de bioinformatique, de génomique, de spectrométrie de masse et de cytométrie en flux, de même que le personnel de l'animalerie.

Pour leur soutien financier, j'aimerais également remercier de nombreux organismes: les Instituts de Recherche en Santé du Canada, les Fonds de recherche du Québec – Santé, la fondation Cole et le programme de biologie moléculaire.

Merci aux membres qui ont formés mes différents comités de thèse et qui m'ont conseillé et guidé dans mon cheminement : Étienne Gagnon, Réjean Lapointe, Claude Daniel et John Stagg. J'aimerais aussi remercier les membres de ce présent jury, pour avoir pris le temps de lire et de commenter cette thèse : Trang Hoang, Martin Guimond et Alain Lamarre.

Un gros merci à ma famille pour son support et ses encouragements. Vous m'avez toujours dit que dans la vie, on doit faire ce qu'on aime et ce mantra a marqué chacune de mes décisions. Merci d'avoir fait de moi la personne que je suis.

Et finalement, mon époux. Merci de m'avoir permis de si bien concilier le travail et la famille et d'avoir assumé mon rôle parental en plus du tien à de nombreuses reprises. Merci de m'avoir toujours écouté et conseillé, et d'avoir toujours supporté mes décisions. Merci de ta présence dans mes moments plus difficiles, d'avoir toujours su me remonter le moral et de m'avoir fait rire quand je ne pensais pas y arriver. La route jusqu'ici a été longue et sinueuse, mais nous y sommes arrivés!

## Avant-propos

Le domaine de l'immunothérapie du cancer suscite présentement un intérêt sans précédents et les bénéfices liés à l'intégration de ces thérapies comme traitement de première ligne contre le cancer ne sont plus à démontrer. Néanmoins, bien que de nombreux succès thérapeutiques aient été observés dans les centaines d'essais cliniques menés au cours des dernières années, de nombreuses questions demeurent sans ou partiellement sans réponse, notamment : Quelles sont les meilleures cibles pour l'immunothérapie du cancer? Comment les identifier de façon rapide et reproductible? Quels paramètres peuvent nous permettre de sélectionner et de prioriser les meilleurs candidats pour les applications cliniques? Les travaux présentés dans cette thèse aborderont précisément ces questions, dans le but de comprendre comment différents types d'antigènes présentés à la surface des cellules cancéreuses permettent l'établissement de réponses anti-tumorales par des lymphocytes T et d'établir des règles facilitant leur utilisation en contexte clinique.

## Plan de thèse

Le système immunitaire occupe une place très importante dans les défenses de l'organisme contre les invasions pathogéniques et contre le développement du cancer. Dans le **Chapitre 1**, nous allons voir comment le système immunitaire, particulièrement le système immunitaire adaptatif, est généré. Puis, nous verrons les mécanismes de la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T en condition physiologique et pathologique. Finalement, nous verrons comment ces principes sont exploités par les différents types d'immunothérapies qui sont présentement en développement et qui visent à manipuler les réponses immunitaires pour éliminer les cellules cancéreuses. Plus spécifiquement, l'utilisation du transfert adoptif de lymphocytes T reconnaissant les cellules cancéreuses est d'un attrait particulier pour le traitement du cancer, due à sa grande spécificité et sa faible toxicité. Le **Chapitre 2** débute par une discussion portant sur le transfert allogénique de cellules hématopoïétiques, puis met en contexte la pertinence et les défis derrière l'utilisation du transfert adoptif de lymphocytes T ciblant différents types d'antigènes présentés sur les cellules cancéreuses. Les **Chapitres 3 et 5** présentent les résultats de nos travaux visant à comparer le potentiel anti-tumoral de différents

types d'antigènes présentés à la surface des cellules cancéreuses et à déterminer quels sont les critères permettant de dicter l'amplitude des réponses immunitaires qu'ils initient. Dans le **Chapitre 3**, nous avons d'abord comparé des antigènes surexprimés à la surface des cellules cancéreuses, à celui de la classe principale d'antigènes ciblés lors d'un transfert allogénique de lymphocytes T, les antigènes mineurs d'histocompatibilité. Puis, nous avons voulu évaluer le potentiel anti-tumoral de lymphocytes T reconnaissant des antigènes découlant d'altérations génétiques spécifiques aux cellules cancéreuses. De par leur nature cancer-spécifique, l'identification de ces antigènes demeure un défi et les différentes méthodes d'identification de ces antigènes développées au cours des dernières années sont exposées dans le **Chapitre 4**. Cet addendum à l'introduction permet donc de situer le contexte dans lequel nous avons entrepris les travaux exposés dans le **Chapitre 5**. Dans ce chapitre, nous dévoilons une nouvelle approche visant à identifier tous les types d'antigènes cancer-spécifiques présents dans un individu et tentons de comprendre les mécanismes dictant leur potentiel anti-tumoral.

Dans le **Chapitre 6**, nous reviendrons sur les résultats principaux obtenus dans le cadre des travaux exposés dans les chapitres 3 et 5, et discuterons de l'impact qu'ont nos découvertes dans le domaine de l'immunothérapie.

Enfin, l'**Annexe I** fait référence à un article dont il est fait mention dans l'introduction et qui démontre que la nature des peptides présentés aux lymphocytes T est grandement influencée par les signaux extracellulaires et donc, que la représentation de ces peptides est plastique. Ces résultats permettent de mettre en perspective l'impact de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur le résultat des immunothérapies.

# **Chapitre 1**

## INTRODUCTION

# 1. Introduction

Les différentes cellules générées dans la moelle osseuse forment le système immunitaire inné et adaptatif. Nous verrons d'abord les différents types cellulaires composant ces deux compartiments (**Section 1**), puis nous nous attarderons aux molécules impliquées dans la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T, c'est-à-dire les molécules de classe I et de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, ainsi qu'à la nature des antigènes qu'elles présentent (**Section 2**). Nous verrons ensuite comment la reconnaissance antigénique est cruciale pour l'éducation, la maturation et l'homéostasie des cellules T, de même que pour leur activation en conditions pathologiques et dans le cancer (**Section 3**). Finalement, nous discuterons des différents types de thérapies, dites immunothérapies, qui exploitent les concepts expliqués dans les sections précédentes pour le traitement des néoplasies. Nous aborderons le principe derrière les thérapies qui sont présentement à l'étude et discuterons de leur efficacité dans le traitement contre le cancer (**Section 4**). Nous terminerons l'introduction par une mise en contexte de la première partie des travaux de cette thèse, permettant de les situer dans un domaine en croissance exponentielle (**Section 5**).



## **1.1 Le système immunitaire**

Le système immunitaire joue un rôle primordial dans la prévention et l'élimination de menaces pouvant nuire au bon fonctionnement de l'organisme. Les barrières physiques (mucus, cils épithéliaux, jonctions cellulaires, etc) représentent la première ligne de défense contre les intrusions, en limitant les contacts entre les pathogènes et l'organisme<sup>1</sup>. En seconde ligne de défense, des mécanismes cellulaires sont mis en place pour rapidement reconnaître et éliminer les bactéries, les virus, les parasites, les allergènes ou les toxines, tout en préservant, dans la mesure du possible, l'intégrité des tissus<sup>2</sup>.

Tous les composants cellulaires du système immunitaire sont générées dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC), qui donneront naissance à des cellules plus différenciées nommées cellules progénitrices multipotentes (MPP)<sup>3,4</sup>. Selon le modèle actuel de développement des cellules du système hématopoïétique, les cellules MPP évoluent progressivement vers les différents compartiments myéloïdes et lymphoïdes<sup>5,6</sup>, donnant naissance aux progéniteurs de mégacaryocyte/érythrocyte<sup>7</sup> ou aux progéniteurs pluripotents lympho-myéloïde (LMPP)<sup>8</sup>. Dans cette section, il sera question des caractéristiques et des fonctions des cellules dérivant des LMPP formant les systèmes immunitaires innés et adaptatifs, qui sont dotées de mécanismes leur permettant de distinguer le « soi » du « non-soi ». En effet, ces cellules expriment des récepteurs encodés de façon germinale pour le système immunitaire inné et de façon somatique pour le système immunitaire adaptatif, qui reconnaissent respectivement des motifs moléculaires généraux ou spécifiques présents sur les éléments pathogéniques<sup>2</sup>.

### **1.1.1 Les cellules du système immunitaire inné**

Les neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes, macrophages, monocytes et cellules dendritiques (DC) sont les cellules qui composent le compartiment immunitaire inné<sup>2</sup>. Celles-ci sont capables de reconnaître spécifiquement des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), tels que des lipides, des protéines, des lipoprotéines, des glycanes et des acides nucléiques, grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR)<sup>9</sup>. Parmi ces PRR, on retrouve les récepteurs de type RIG (RLR) qui sont associés à la

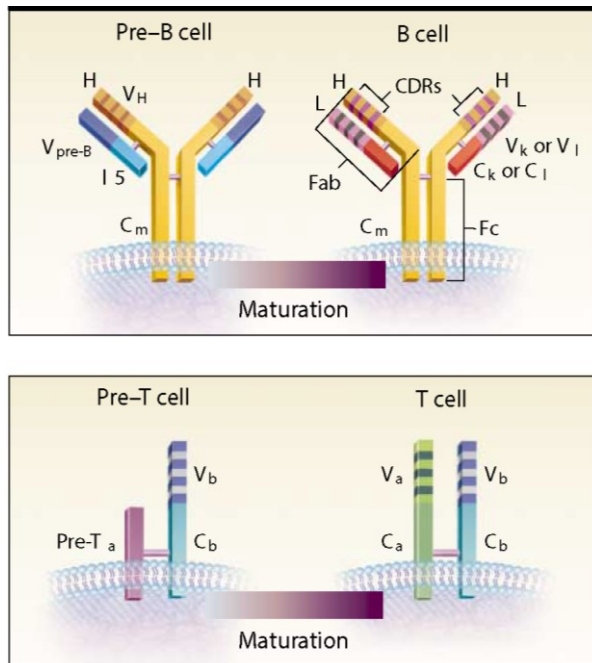
reconnaissance d'ARN (acide ribonucléique) dans le cytoplasme. En contrepartie, les récepteurs de type NOD (NLR) sont spécialisés dans la reconnaissance de peptidoglycanes bactériens<sup>10</sup>. Finalement, les récepteurs de type Toll (TLR) composent la famille de PRR la plus diversifiée, dans laquelle plusieurs types ont été identifiés chez l'humain (10) et la souris (12), dont 9 sont partagés entre les deux espèces. Présents à la surface cellulaire ou dans les endosomes ou lysosomes, les TLR reconnaissent des PAMP, tels que des lipoprotéines, des composants de la paroi cellulaire des bactéries comme le lipopolysaccharide, des flagelles bactériens, de l'ADN double brin d'origine virale, de l'ARN simple brin, de l'ARN ribosomal ou de l'ADN enrichi de motifs CpG<sup>11</sup>. Peu importe le récepteur utilisé, la reconnaissance d'un PAMP permet l'activation des cellules du compartiment immunitaire inné et entraîne la sécrétion d'un vaste répertoire de molécules pro-inflammatoires, de composants des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), de cytokines, de chimiokines et de molécules cytotoxiques<sup>12-14</sup>. De par les récepteurs qu'elles expriment et les cytokines qu'elles sécrètent, les cellules du système immunitaire inné peuvent initier et organiser les réponses immunitaires en réponse à un vaste répertoire de pathogènes et contribuent à l'établissement de la réponse immunitaire adaptative.

### **1.1.2 Le système immunitaire adaptatif**

Le système immunitaire adaptatif est en mesure de compléter les réponses immunitaires innées grâce à une reconnaissance plus spécifique de motifs de pathogènes, laquelle leur permet d'initier des réponses immunitaires qui perdurent dans le temps. Ayant longtemps été perçu comme un système unique aux gnathostomes, il est maintenant reconnu qu'un système immunitaire similaire est présent dans certains cyclostomes, notamment chez la lamproie et la myxine<sup>15</sup>. Les cellules de l'immunité adaptative sont caractérisées par la présence de récepteurs de cellules B (BCR) ou de cellules T (TCR) qui peuvent reconnaître des antigènes dans leur conformation native ou des peptides associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (pCMH), et sont responsables des réponses dites humorales et cellulaires, respectivement<sup>2</sup>.

Tandis que les lymphocytes B débutent et poursuivent leur maturation dans la moelle osseuse, les cellules précurseur des lymphocytes T quittent la moelle osseuse à un stade encore immature, pour terminer leur maturation dans le thymus<sup>1</sup>. Les récepteurs de lymphocytes T et

B sont composés de segments V (variable), D (diversité), J (jonction) et C (constant) qui sont assemblés pour former un récepteur grâce à l'expression des gènes activant la recombinaison (RAG) 1 et 2<sup>16,17</sup> (**Figure 1.1**). Une caractéristique importante du système immunitaire adaptatif est que chaque récepteur de lymphocytes T et B est spécifique à un antigène et que, dans la plupart des cas, chaque cellule présente des récepteurs d'une seule spécificité<sup>16,18</sup>. Puisqu'une telle quantité d'information est impossible à encoder génétiquement, la génération d'un répertoire diversifié de récepteurs est possible grâce à un processus de recombinaisons somatiques et de mutation des gènes encodant ces récepteurs. Ces mécanismes sont étroitement régulés et sont très similaires pour les lymphocytes B et les lymphocytes T<sup>2</sup>.



**Figure 1.1. Structure des récepteurs immatures et matures de cellules B et de cellules T.** Les récepteurs de cellules pré-B et pré-T immatures expriment des versions préliminaires des récepteurs d'antigènes. Composé d'une paire de chaîne lourde (H) et d'une paire de chaîne temporaires légères nommées  $V_{pre-B}$  et  $\lambda 5$  pour les cellules B, et d'une chaîne  $\beta$  combiné à une chaîne pré-T $\alpha$  pour les cellules T. Les différentes étapes de maturation permettront aux lymphocytes B d'acquérir un récepteur fonctionnel qui sera exprimé à leur surface sous la forme d'un BCR, ou qui pourra être sécrété sous forme d'anticorps. Les lymphocytes T quant à eux, expriment seulement une forme membranaire de leur TCR. Reproduit

avec permission de Delves PJ et Roitt IM, copyright Massachusetts Medical Society (2000)<sup>16</sup>

Le TCR sur les lymphocytes T est un hétérodimère formé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  (90-95 % des cellules T) ou d'une chaîne  $\gamma$  et d'une chaîne  $\delta$  (5-10 % des cellules T)<sup>2,18</sup>. Les chaînes  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\alpha$ ,  $\gamma$  subissent le processus de recombinaison somatique de façon séquentielle, dans lequel les protéines RAG1 et RAG2 clivent d'abord l'ADN aux sites de séquence de signal de recombinaison (RSS)<sup>19,20</sup>. Puis, un nombre variable mais limité de nucléotides est ajouté aux séquences clivées lors de la réparation de l'ADN par la désoxynucléotidyl transférase terminale

(TdT)<sup>21</sup>. Par conséquent, ces modifications peuvent entraîner des changements dans le cadre de lecture du transcrit et créer des recombinaisons dites non-productives dans 66% des cas<sup>19,20</sup>. Seuls les réarrangements productifs de leurs récepteurs permettent la prolifération des lymphocytes T, de même que l'expression de ce récepteur à leur surface. Ces lymphocytes matures mais naïfs, c'est-à-dire n'ayant jamais rencontré un antigène, présentent à leur surface les TCR nouvellement formés, couplés à des chaînes invariables qui permettent la transduction du signal lors de la rencontre de l'antigène; le complexe CD3, composé des hétérodimères CD3 $\gamma\epsilon$  et CD3 $\delta\epsilon$  et de l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$ <sup>2,16</sup>. Les réponses immunitaires générées par les lymphocytes T seront vues plus en détail à la section 1.3.2 (page 20). Les mécanismes de recombinaison somatique pour les lymphocytes B sont très similaires à ceux détaillés pour les lymphocytes T. Dans le cas des immunoglobulines (Ig), ce sont deux couples de chaînes lourdes et légères qui composent la portion extracellulaire du BCR et qui permettent la reconnaissance antigénique. Suite à un réarrangement productif de leurs récepteurs, les lymphocytes B vont présenter les Ig à leur surface couplés aux chaînes invariables Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  pour former le BCR.

### **1.1.3 Le cas particulier des cellules NKs**

Les cellules NK sont phénotypiquement similaires aux lymphocytes T mais ne possèdent pas de récepteur de reconnaissance spécifique de type BCR ou TCR. Pour cette raison, elles sont classifiées comme appartenant au compartiment immunitaire inné, bien que leur capacité de mémoire immunologique ait récemment été mise en évidence<sup>2,22</sup>. Les cellules NK-T représentent quant à elles une sous-catégorie de lymphocyte T qui possèdent un TCR $\alpha\beta$ , mais qui reconnaissent des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) atypiques présentant des glycolipides à leur surface (CD1)<sup>23</sup>.

La reconnaissance du « non-soi » par les cellules du système immunitaire leur permet d'acquérir des capacités de sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'autres molécules effectrices qui jouent un rôle dans la génération et l'homéostasie des cellules du système immunitaire, de même que dans l'induction, le contrôle et la contraction de la réponse immunitaire. De plus, la communication entre le système immunitaire inné et adaptatif permet l'orchestration de la réponse immunitaire pour répondre rapidement et efficacement à la menace. Dans les sections suivantes, nous verrons plus spécifiquement comment les lymphocytes T

perçoivent et répondent aux insultes immunologiques dans un contexte d'infection et de cancer. Bien que les lymphocytes  $T\gamma\delta$  occupent un rôle important dans la surveillance immunitaire, particulièrement dans les muqueuses<sup>16</sup>, il ne sera développé dans ce manuscrit que les réponses engagées par les lymphocytes  $T\alpha\beta$ .

## 1.2 La présentation antigénique

Les lymphocytes T possèdent des récepteur qui peuvent reconnaître une grande variété d'éléments appelés antigènes, provenant, entre autres, de pathogènes. Ces antigènes sont associés à une molécule de classe I ou de classe II du CMH qui permettent leur présentation à la surface cellulaire. Le processus par lequel les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules saines vont apprêter et présenter les complexes pCMH aux lymphocytes T se nomme la présentation antigénique. Ce processus en est un crucial dans les réponses immunitaires puisqu'elle permet la reconnaissance antigénique (vu à la section 1.3) par les lymphocytes T, qui eux, jouent un rôle très important dans l'orchestration de la réponse immunitaire et l'élimination des menaces détectées par l'organisme<sup>24,25</sup>.

### 1.2.1 Les molécules du CMH

Les molécules du CMH, aussi appelées antigènes leucocytaires humains (HLA) chez l'humain, sont des glycoprotéines transmembranaires qui permettent la présentation d'une grande variété de fragments protéiques aux lymphocytes T. Ces antigènes dérivent des compartiments intracellulaires et extracellulaires et possèdent une large gamme de spécificités de liaisons<sup>25</sup>. Afin de permettre la présentation de cette grande variété de spécificités antigéniques, les molécules du CMH doivent posséder deux caractéristiques très importantes : celles-ci doivent être polygéniques et polymorphiques.

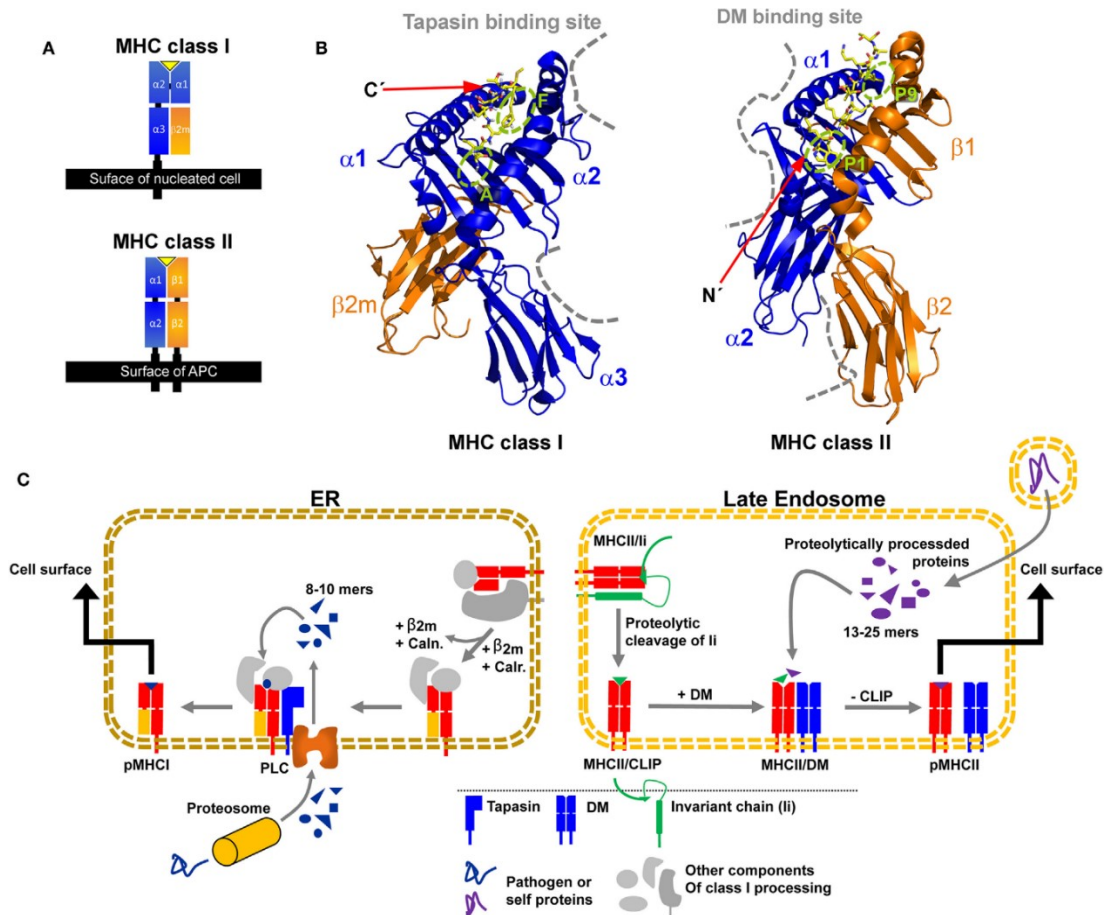
D'une part, les gènes codant pour les molécules du CMH sont polygéniques. En effet, le segment encodant le CMH chez l'humain contient plus de 200 de gènes, incluant les gènes codant pour les molécules de classe I classique (HLA-A, -B et -C chez l'humain; H2-K, H2-D et H2-L chez la souris), ceux codant pour les molécules de classe II (HLA-DR, -DQ et -DP chez l'humain; I-A et I-E chez la souris) et des molécules de classe I non-classique (par exemple, CD1 reconnues par les cellules NK)<sup>24,26</sup>. D'autre part, la région de liaison du peptide dans la

pochette du CMH est extrêmement polymorphique à l'échelle de la population. En effet, en date de mars 2017, la base de données HLA Nomenclature (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>) recensait plusieurs milliers d'allèles HLA différents, rendant ces gènes les plus polymorphiques connus<sup>24</sup>. À l'échelle de l'individu, la diversité des molécules du CMH permet la présentation d'un vaste répertoire d'antigènes provenant de sources endogènes ou exogènes à la cellule, assurant la présentation à la surface cellulaire de pratiquement n'importe quelle séquence antigénique. À l'échelle de la population, cette diversité permet à différents individus de présenter différents antigènes provenant d'une même source. Du point de vue de la sélection naturelle, bien qu'il soit possible qu'un pathogène acquiert des compétences rendant ses antigènes invisibles aux yeux des lymphocytes T d'un individu, la diversité dans le répertoire des CMH permet d'éviter ce genre d'évènement à l'échelle de la population<sup>24</sup>.

Dans la section suivante, il sera question des mécanismes généraux de la présentation antigénique sur les molécules de classe I et de classe II du CMH. Malgré qu'ils soient encore mal compris, des mécanismes de présentation antigénique croisée sont également possibles<sup>27</sup> mais ne seront pas abordés davantage dans le cadre de cette thèse.

## 1.2.2 Les molécules de classe I du CMH

Les molécules du CMH I sont exprimées sur presque toutes les cellules nucléées, quoi qu'en niveaux différents. En contrepartie, les cellules du cerveau et des testicules n'expriment que très peu voire pas du tout de molécules du CMH I. Celles-ci sont formées, chez l'humain comme chez la souris, d'un hétérodimère composé d'une chaîne  $\alpha$  possédant trois domaines ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) et d'une chaîne  $\beta$  ( $\beta 2$ -microglobuline,  $\beta 2m$ ). Tandis que les domaines  $\alpha 3$  et  $\beta 2m$  permettent l'encrage à la membrane, les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  forment le domaine de liaison de l'antigène (**Figure 1.2a, b**)<sup>28</sup>. Ce dernier possède une conformation fermée en ses extrémités qui lui permet de lier des antigènes ayant généralement une longueur de 8 à 11 acides aminés<sup>1,29</sup>, bien que certains antigènes ayant une longueur pouvant aller jusqu'à 15 acides aminés ont été identifiés<sup>30</sup>.



**Figure 1.2. Caractéristiques structurales des protéines du CMH de classe I et du CMH de classe II et le chargement de leurs peptides apprêtés par leurs compartiments respectifs.** (A) Topologie du domaine d'un complexe pCMH de classe I et pCMH de classe II. (B) Structure d'une molécule du CMH en association avec un peptide (CMH I à gauche, CMH II à droite). Les sites d'interaction du CMH de classe I avec la tapasine et du CMH de classe II avec DM sont illustrés par des lignes grises pointillées et le peptide est illustré en jaune. (C) Illustration simplifiée de la voie de l'apprêtement et de la présentation antigénique de classe I (gauche) et II (droite). Caln., Calnexine; Calr., Calréticuline; PLC, Complexe de chargement du peptide. **Copyright:** © 2017 Wieczorek, Abualrous, Sticht, Álvaro-Benito, Stolzenberg, Noé and Freund <sup>28</sup>.

### 1.2.2.1 Présentation antigénique classique de classe I

La majorité des antigènes de la voie de la présentation antigénique de classe I proviennent de la digestion de protéines intracellulaires par le protéasome. Ce dernier est responsable de la dégradation de protéines ciblées par le système ubiquitine-protéasome, lui conférant ainsi un rôle crucial dans plusieurs autres fonctions biologiques telles que la régulation du cycle

cellulaire, l'homéostasie et la différenciation cellulaire<sup>31</sup>. Parmi les quatre types de protéasomes connus, seuls trois ont un rôle dans l'apprêtement des antigènes pour leur présentation à la surface cellulaire : le protéasome constitutif (CP), l'immunoprotéasome (IP) et le thymoprotéasome (TP)<sup>32</sup>.

Le CP possède trois sous-unités responsables de son activité catalytique ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$ ), possédant chacune des préférences de clivage spécifiques, notamment au niveau des résidus acides (activité de type caspase;  $\beta 1$ ), basiques (activité de type trypsine,  $\beta 2$ ) ou hydrophobiques (activité de type chymotrypsine;  $\beta 5$ )<sup>33</sup>. L'IP est exprimé chez les gnathostomes de façon constitutive dans un nombre restreint de cellules, tels que les lymphocytes T et B, les DC et les cellules épithéliales de la médulla thymique, mais son expression peut être induite dans presque tous les tissus par l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Sa structure est identique à celle du CP, à l'exception des sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  qui sont remplacées dans l'immunoprotéasome par les sous-unités  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  et  $\beta 5i$ <sup>32</sup>. Les préférences de clivage de l'IP sont différentes de celles du CP et permettent de générer plus efficacement les antigènes présentés à la surface cellulaire dans le contexte du CMH de classe I<sup>32,33</sup>. Bien qu'il ait longtemps été considéré que la fonction des IP était la présentation antigénique dans un contexte de rencontre de pathogènes, plusieurs rôles dans la régulation de l'homéostasie cellulaire lui ont depuis été attribués<sup>34-36</sup>. Finalement, le TP est un type de protéasome exclusivement retrouvé dans les cellules épithéliales du cortex thymique (cTEC)<sup>37</sup>, lequel est composé des sous-unités  $\beta 1i$  et  $\beta 2i$  comme l'IP, mais dans lequel la sous-unité  $\beta 5i$  est remplacée par la sous-unité  $\beta 5t$ . Celui-ci joue un rôle crucial dans l'éducation des lymphocytes T, et sera abordé d'avantage dans la section 1.3.1.1.1 (page 15)<sup>33</sup>.

Quel que soit le type de protéasome responsable de la dégradation des protéines dans le cytoplasme, seuls certains des peptides résultants sont acheminés vers le réticulum endoplasmique (ER) grâce à un hétérodimère protéique appelé protéine de transport d'antigènes (TAP), formé de TAP1 et TAP2. En effet, on estime que la demi-vie des peptides dans le cytosol n'est que de 6 à 10 secondes et que moins de 1% des peptides générés par le protéasome seront présentés à la surface cellulaire<sup>38-40</sup>. Suite à leur entrée dans le ER, les peptides trop courts sont expulsés dans le cytoplasme grâce à la protéine transmembranaire ERAD (Protéine de dégradation associée au réticulum endoplasmique) pour être recyclés. En contrepartie, les



peptides plus longs sont clivés à leur extrémité N-terminale par ERAAP (aminopeptidase du réticulum endoplasmique associée à l'apprêtement antigénique; aussi appelée ERAP1). Parallèlement, des molécules du CMH I naissantes et dépourvues de peptides sont stabilisées dans le ER, d'abord par la calnexine, puis par la calréticuline et ERp57 lorsque la  $\beta$ 2m est intégrée au complexe<sup>24</sup>. Le chargement du peptide dans la cavité d'une molécule du CMH I est possible grâce à l'interaction de la tapasine avec TAP d'une part et avec ERp57 sur les molécules du CMH d'autre part<sup>41</sup>. Les complexes pCMH ainsi stabilisés sont exportés à la surface cellulaire par la voie sécrétoire du golgi pour la présentation antigénique (**Figure 1.2c**)<sup>24</sup>.

La voie de la présentation antigénique est donc une voie complexe mais cruciale pour la définition du soi dans un contexte de présentation au CMH de classe I, puisqu'elle permet de refléter l'état interne de la cellule à la surface cellulaire.

### 1.2.2.1 Origine des peptides présentés par les molécules du CMH I

En condition physiologique, l'ensemble des peptides présentés à la surface cellulaire, connu comme étant l'immunopeptidome, dérivent de protéines du soi, c'est-à-dire de protéines générées depuis la traduction d'ARNm normaux, propres à la cellule<sup>35</sup>. En condition pathologique, l'immunopeptidome est également composé de peptides provenant du « non-soi » ou du « soi-altéré », provenant d'une part de pathogènes et d'autre part, de séquences génétiques modifiées suite à un processus mutationnel, par exemple, dans un contexte de cancer.

Il a longtemps été considéré que les peptides composant l'immunopeptidome sont générés depuis des transcrits codants pour des protéines traduites dans le cadre de lecture canonique, celles-ci représentant 1% du génome<sup>35,42</sup>. Cependant, des analyses de données transcriptomiques et de profilage de ribosomes ont démontré que plusieurs régions dites « non-condantes » sont occupées par des ribosomes et qu'en conséquence, jusqu'à 75% du génome pourrait être traduit<sup>43,44</sup>. De fait, tant en condition physiologique que pathologique, les cellules peuvent présenter des peptides dits cryptiques, qui représentent au moins 10% de l'immunopeptidome et qui proviennent de traductions atypiques de transcrits, c'est-à-dire de régions 3' et 5'UTR, de jonctions exon-intron, de régions introniques, de cadres de lectures non canoniques d'exons connus ou non et de transcrits antisense<sup>45,46</sup>. Finalement, l'immunopeptidome contient également des peptides avec des modifications post-

traductionnelles ou qui dérivent de produits de fusion de fragments peptidiques suite à la dégradation de polypeptides par le protéasome, quoi que l'identification de ces derniers demeure controversée<sup>47,48</sup>.

L'immunopeptidome est donc plastique, permettant aux cellules de représenter leur état interne aux lymphocytes T pour la reconnaissance antigénique. En effet, il est variable selon le type cellulaire étudié et peut être modulé par les événements métaboliques et néoplasiques affectant la cellule<sup>49-51</sup>, sujet également abordé dans l'Annexe I. Cependant, bien que les peptides formant l'immunopeptidome proviennent globalement de transcrits exprimés en plus grande abondance dans la cellule, les transcrits et les protéines les plus abondants ne sont pas nécessairement source de peptides<sup>35,44,52-54</sup>. Cette apparente dichotomie peut être expliquée par la théorie des produits défectueux du ribosome (DRiP), proposée dans les années 90 par Yewdell et Bennick<sup>55</sup>, qui propose que des polypeptides qui n'ont pas atteint leur conformation finale, dû à des défauts à divers niveaux durant le processus de traduction, sont la source préférentielle de peptides pour les molécules du CMH I<sup>56</sup>. Ainsi, bien que les protéines ayant terminé leur cycle de vie utile peuvent composer une partie de l'immunopeptidome<sup>55,57,58</sup>, celui-ci serait composé principalement de peptides dérivant de protéines de courte durée de vie<sup>59</sup>, ce qui inclut les protéines mal traduites ou mal repliées, les protéines ayant des signaux de terminaison prématurés et les protéines provenant de mécanismes de traduction atypiques<sup>35,56,60</sup>.

En résumé, l'immunopeptidome du CMH I permet de refléter l'état interne de la cellule en présentant des peptides provenant de produits de traduction conventionnels ou cryptiques, qui appartiennent majoritairement à la famille des protéines rapidement dégradées ou de produits défectueux du ribosome.

### **1.2.3 Les molécules de classe II du CMH**

Les molécules du CMH de classe II sont exprimées de façon constitutive uniquement sur les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, lymphocyte B et DC) et sur les cellules épithéliales de la médulla thymique<sup>28</sup>, mais leur expression peut être induite sur certaines cellules épithéliales et endothéliales suite à une stimulation par l'IFN- $\gamma$ <sup>28,61</sup>. Comme pour les molécules du CMH I, les molécules de classe II du CMH sont formées d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  formant un hétérodimère mais leur conformation diffère des premières puisque chaque

chaîne  $\alpha$  et  $\beta$  sont formées de 2 domaines ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) pour lesquels les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  sont responsables de la liaison à l'antigène et les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  permettent l'encrage à la membrane cellulaire (**Figure 1.2a**)<sup>28</sup>. La cavité formée par la jonction des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  est ouverte en ses extrémités, permettant la liaison de peptides d'une longueur supérieure à celle permise pour les molécules du CMH I. D'une longueur de 13 à 18 acides aminés, allant même jusqu'à 30 acides aminés<sup>62,63</sup>, les peptides peuvent ainsi dépasser de part et d'autre la pochette de liaison des peptides (**Figure 1.2b**)<sup>24</sup>.

### 1.2.3.1 La présentation antigénique de classe II

La voie de la présentation antigénique est radicalement différente pour les molécules du CMH II par rapport à celle pour les molécules du CMH I. En effet, tandis que la présentation antigénique de classe I dépend d'évènements métaboliques intracellulaires, la présentation antigénique de classe II présente principalement des antigènes exogènes qui sont apprêtés grâce à une protéolyse dans les endosomes et les lysosomes<sup>24,64</sup>. Selon le mécanisme de reconnaissance antigénique et le type de cellule présentatrice d'antigène impliqué, différents processus d'endocytose sont utilisés : la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine, la phagocytose et l'autophagie. Possibles dans les différents types de cellules présentatrices d'antigènes quoiqu'à des niveaux d'efficacité différents<sup>27</sup>, les trois premiers processus permettent la présentation d'antigènes internalisés depuis des sources exogènes tandis que le dernier permet de présenter des antigènes d'origine intracellulaires<sup>24,64</sup>.

Les molécules du CMH de classe II sont générées dans le ER où elles sont stabilisées par une chaîne invariante (Ii) et sont acheminées directement ou indirectement aux compartiments endosomaux-lysosomaux d'apprêtement d'antigène (MIIC; compartiment du CMH de classe II)<sup>38,64-66</sup>. Une fois dans le MIIC, la chaîne Ii est dégradée par protéolyse grâce à la cathepsine S (cellules hématopoïétiques) ou la cathepsine L (cellules épithéliales du cortex thymique)<sup>33,38</sup>. Un petit fragment nommé peptide de la chaîne invariante (CLIP), inaccessible par les protéases, demeure dans la pochette de liaison du peptide des molécules du CMH II et est éventuellement retiré grâce à l'enzyme HLA-DM (H2-DM chez la souris), permettant ainsi l'insertion d'un peptide. Une fois formés, les complexes pCMH II sont acheminés vers la membrane cytoplasmique pour la présentation antigénique (**Figure 1.2c**)<sup>24,25,38,64</sup>.

## **1.3 La reconnaissance antigénique**

La reconnaissance antigénique est le processus par lequel les lymphocytes T CD8 ou CD4 vont respectivement reconnaître les complexes pCMH de classe I et de classe II, tant en contexte physiologique qu'en contexte pathologique. Dans cette section, il sera d'abord question de la reconnaissance antigénique en contexte physiologique, processus nécessaire pour l'éducation des lymphocytes T à la tolérance au soi et pour leur maintien en périphérie. Ensuite, nous aborderons les mécanismes de reconnaissance antigénique en contexte pathologique, permettant l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative par les lymphocytes T CD8 et CD4.

### **1.3.1 La reconnaissance antigénique en condition physiologique, un processus crucial pour l'éducation et l'homéostasie des lymphocytes T**

La reconnaissance du « non-soi » est primordiale pour la défense de l'organisme, puisque la non-reconnaissance d'agents pathogènes peut entraîner des conséquences désastreuses chez l'individu. C'est pourquoi, au cours de leur vie fonctionnelle, les lymphocytes T vont scanner les différents complexes pCMH qu'ils rencontrent, à la recherche d'antigènes anormaux. Néanmoins, l'éducation à la tolérance au « soi » est tout aussi importante pour prévenir les réactions d'auto-immunité que pourrait engendrer la circulation de lymphocytes T auto-réactifs. La tolérance centrale permet, au cours de la maturation des lymphocytes T CD8 ou CD4 dans le thymus, d'éliminer les cellules représentant un danger pour l'organisme. Des mesures supplémentaires sont également mises en place en périphérie afin de contrôler les lymphocytes T matures potentiellement auto-réactifs ayant échappé à la tolérance centrale.

#### **1.3.1.1 La tolérance centrale**

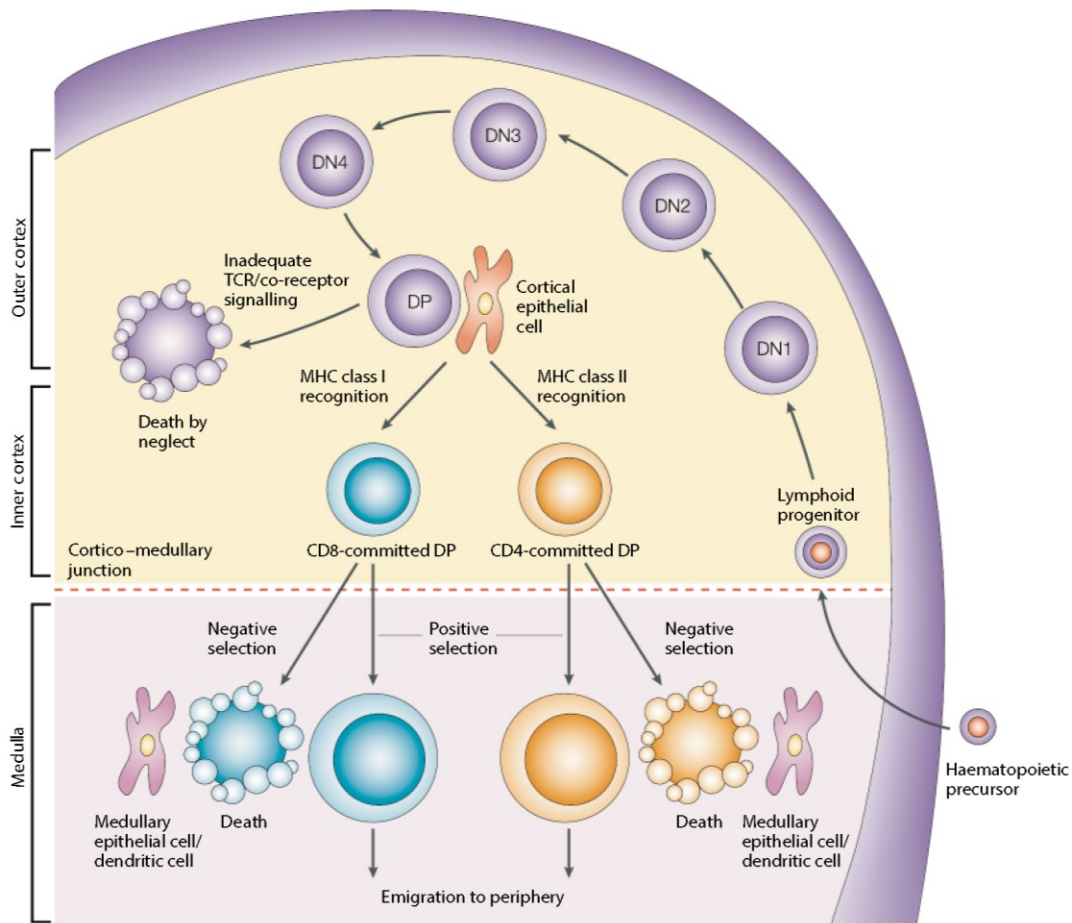
Le thymus est un organe qui atteint sa maturité fonctionnelle après la naissance mais qui subit une involution dès la puberté<sup>67</sup>. Son importance dans l'homéostasie des lymphocytes T est soulignée par la propension plus élevée qu'ont les enfants ayant des petits thymus à développer des infections mortelles<sup>68</sup>, mais également par l'involution thymique plus rapide observée chez les individus souffrant d'immunodéficiences impliquant les lymphocytes T<sup>69</sup>. Par ailleurs, en

plus de posséder un rôle très important dans l'éducation des lymphocytes T, le thymus permet le développement et la maturation des lymphocytes immatures (appelés thymocytes) jusqu'aux lymphocytes T matures. Deux régions se distinguent dans thymus, le cortex et la médulla, où les cellules épithéliales thymiques (TEC) vont interagir avec les thymocytes *via* la présentation de peptides par les molécules de classe I ou classe II du CMH (**Figure 1.3**).

#### **1.3.1.1.1 La présentation antigénique dans le cortex**

Les thymocytes entrent dans le thymus au niveau d'une région appelée jonction cortico-médullaire, puis migrent vers le cortex, formé d'un réseau de cTEC qui supportent les interactions avec les thymocytes<sup>70</sup>. À leur entrée dans le cortex, les thymocytes sont doubles négatifs (DN) selon une nomenclature faisant référence à l'expression de co-récepteurs CD4 et CD8 qui permettent la stabilisation de l'interaction des TCR avec les molécules du CMH de classe II ou de classe I, respectivement. Les thymocytes DN subissent plusieurs étapes de maturation<sup>71</sup>, durant lesquelles ils subissent un réarrangement de leur TCR (section 1.1.2, page 4). C'est au stade final de la maturation des DN que les thymocytes vont acquérir un TCR $\alpha\beta$  et vont exprimer simultanément les co-récepteurs CD4 et CD8; les cellules sont alors doubles positives (DP). Cette étape de maturation est marquée par le processus de la sélection positive, lequel permet de sélectionner les cellules immatures DP qui expriment un TCR fonctionnel avec une affinité intermédiaire pour un complexe pCMH du soi présenté sur les cTEC. On estime que moins de 10% des thymocytes DP poursuivent leur différenciation et leur maturation suite à cette étape de sélection<sup>33,70</sup>. L'interaction de ces cellules avec des pCMH à la surface des cTEC permet également l'engagement définitif les thymocytes à la lignée CD4 ou CD8, selon que leur TCR ait interagit avec une molécule du CMH II ou du CMH I, respectivement<sup>33,69,70</sup>.

Grâce à l'expression du thymoprotéasome, de la sérine protéase spécifique au thymus (TSSP)<sup>72</sup> et de la cathepsine L, les cTEC présentent un répertoire de peptides du soi différents de celui présenté par les autres cellules présentes dans le thymus<sup>33</sup>. Les raisons pour lesquelles les cTEC présentent ce répertoire antigénique unique demeurent mal comprises<sup>70</sup>. Néanmoins, il est clair que la perte du thymoprotéasome ou des protéases spécifiques au thymus peut mener à des défauts sévères dans la sélection positive des lymphocytes T CD8<sup>37,73</sup> ou CD4<sup>70,74-76</sup>.



**Figure 1.3. Schématisation générale du développement des lymphocytes T dans le thymus.** Les précurseurs de lymphocytes T qui entrent dans le thymus à la jonction cortico-médullaire n'expriment pas de TCR, de CD4 ou de CD8. Les thymocytes migrent vers le cortex thymique, période durant laquelle ils subissent plusieurs étapes de maturation (DN1 à DN4, puis DP), acquièrent un TCR $\alpha\beta$  mature et subissent une première étape de sélection (sélection positive). Dans la médulla, les thymocytes acquièrent leur phénotype simple positif CD4 ou CD8 et passent par un processus de sélection négative. Les cellules ayant reçu un signal approprié, de force intermédiaire, peuvent être exportées dans la circulation, vers les OLS. Reproduit avec la permission Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology (Germain RN), copyright (2002)<sup>77</sup>

### 1.3.1.1.2 La présentation antigénique dans la médulla

Les thymocytes simple positifs CD4 ou CD8 générés dans le cortex migrent vers la médulla où ils sont sujets au processus de sélection négative dans lequel les cellules exprimant un TCR de haute affinité pour des complexes pCMH présentant des antigènes du soi sont éliminées<sup>33</sup>. Bien qu'ayant lieu majoritairement dans la médulla, une partie de la sélection

négative peut avoir lieu dans le cortex, où des thymocytes DP réactifs contre des gènes ubiquitaires sont éliminés par un processus largement dépendant des DC<sup>70,78</sup>. Les DC jouent également un rôle dans le processus de la sélection négative dans la médulla, aux côtés des lymphocytes B et des cellules de la médulla thymique (mTEC)<sup>79-81</sup>.

Les mTEC jouent un rôle bien important dans la sélection négative des thymocytes puisqu'elles sont capables d'exprimer de façon ectopique, grâce à l'expression de AIRE (régulateur auto-immun), des antigènes provenant de gènes dont l'expression est restreinte à des tissus spécifiques (TRA). Globalement, toutes les mTEC présentent des TRA, bien qu'au niveau individuel, chaque mTEC n'est en mesure d'exprimer que 1-3% des transcrits<sup>70,82</sup>. Cette expression mosaïque permet aux mTEC de supporter la charge protéique découlant de l'expression de ces TRA. Il est d'ailleurs estimé qu'entre 200 et 500 mTEC seraient suffisantes pour exprimer l'ensemble des TRA. Ainsi, pour rendre le processus d'éducation à la tolérance au soi possible, les thymocytes font la rencontre de quelques centaines de mTEC durant leur séjour dans la médulla<sup>70,83-85</sup>. Le processus de sélection négative permet donc aux thymocytes ayant une faible affinité pour les complexes pCMH du soi de poursuivre leur maturation. Suite à la reconnaissance avec une haute affinité de complexes pCMH du soi par les thymocytes, deux scénarios sont possibles. D'une part, la délétion clonale entraîne la mort par apoptose des thymocytes potentiellement auto-réactifs. En contrepartie, la diversion clonale est un processus par lequel les thymocytes CD4 acquièrent des propriétés régulatrices suppressives (lymphocyte T régulateur; T<sub>REG</sub>) et sont caractérisées par l'expression de Foxp3<sup>86</sup>. Il semble que le spectre d'affinité des TCR pour les complexes pCMH du soi permettant la sélection positive, la diversion clonale et la délétion clonale soit très large et comporte plusieurs zones grises. Ainsi, les mécanismes permettant à un même TCR d'activer un programme de signalisation permettant sa survie suite à la sélection positive et la sélection négative sont encore mal compris. Néanmoins, l'achèvement de la maturation des thymocytes dans le thymus permet l'entrée en circulation de lymphocyte T CD8 ou CD4 matures et possédant un TCR fonctionnel, potentiellement réactif au « non-soi » mais surtout, tolérant au soi.

### 1.3.1.2 L'homéostasie des lymphocytes T naïfs en périphérie

Les lymphocytes T naïfs, c'est-à-dire n'ayant jamais rencontré d'antigène, survivent en périphérie durant plusieurs semaines dans un état non prolifératif et ce, en absence d'activation antigénique<sup>87,88</sup>. En condition physiologique, les lymphocytes T circulent entre le sang, la lymphe et les tissus lymphoïdes secondaires (OLS), qui sont composés d'un réseau de cellules stromales et de DC et qui comprennent la rate, les ganglions et autres tissus lymphoïdes associés aux muqueuses<sup>1</sup>. Les cellules dans les OLS interagissent avec les lymphocytes T naïfs et leur facilitent la réception de signaux homéostatiques nécessaires à leur survie<sup>88,89</sup>, par des mécanismes qui dépendent d'abord de la reconnaissance de complexes pCMH du soi. De plus, les lymphocytes T naïfs requièrent des signaux secondaires fournis par des cytokines telles que la lymphopoïétine stromale thymique et les interleukines (IL) 4 et 6. C'est cependant l'IL-7 qui possède le rôle prédominant dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs, démontré par le fait qu'un blocage de la signalisation par l'IL-7 inhibe la survie des lymphocytes T *in vivo*<sup>88,90-92</sup>. De façon importante, les signaux basaux d'homéostasie ne devraient pas permettre l'activation des cellules T naïfs puisque les cellules réactives aux complexes pCMH du soi devraient avoir été éliminées lors du processus de sélection négative dans le thymus<sup>88,93</sup>.

### 1.3.1.3 La tolérance périphérique

Malgré les mécanismes robustes de la tolérance centrale, il est possible que certains lymphocytes T échappent à la sélection négative dû à un manque ou à une faible expression de son antigène dans le thymus<sup>94-97</sup>. Il est également possible que certains lymphocytes T, ayant été activés suite une interaction avec un stimulus pathogénique, deviennent réactifs envers des antigènes du soi par mimétisme moléculaire ou réactivité croisée. En effet, que ce soit parce qu'ils proviennent de régions très proximales sur l'épitope, ou parce que leur charge et leur séquence sont très similaires, certains antigènes du soi et provenant de pathogènes peuvent être perçus comme étant identiques par les lymphocytes T<sup>98,99</sup>. Par ailleurs, il est estimé qu'un seul TCR a la capacité d'interagir avec plusieurs centaines, voire milliers de complexe pCMH, par des mécanismes de réactivité croisée<sup>93,100</sup>. Ainsi, des mécanismes additionnels de tolérances sont mis en place en périphérie afin d'éviter l'activation de lymphocytes T auto-réactifs et le développement de maladies auto-immunes : c'est la tolérance périphérique<sup>86,98</sup>.



L'ignorance représente le premier mécanisme de tolérance périphérique, par lequel des barrières anatomiques forment des sites immunitaires privilégiés, tel que dans le système nerveux central et les yeux, et préviennent la mise en contact des lymphocytes T avec les antigènes présentés sur ces tissus<sup>98,101</sup>. Il est également possible que les antigènes contre lesquels les lymphocytes T seraient réactifs soient présentés en trop faible quantité pour entraîner leur activation<sup>102</sup>.

Des mécanismes cellulaires de tolérance périphérique intrinsèques et extrinsèques aux lymphocytes T sont également mis en place pour limiter l'activation des lymphocytes T auto-réactifs. Pour être activés adéquatement, les lymphocytes T doivent recevoir, en plus du signal primaire par l'interaction avec le pCMH, un signal secondaire positif par des molécules de co-stimulation (discuté dans la section 1.3.2.2.1, page 21)<sup>88,103,104</sup>. Plusieurs études suggèrent que les DC immatures qui résident dans les OLS et qui expriment faiblement les molécules de co-stimulation, permettent l'inactivation fonctionnelle du répertoire de lymphocytes T auto-réactifs<sup>95,98</sup>. Ainsi, la reconnaissance de peptides du soi dans ce contexte tolérogénique entraîne un état d'activation transitoire qui peut mener à la délétion clonale des lymphocytes T ou à leur anergie<sup>97,105-108</sup>, un état dysfonctionnel des lymphocytes T qui se traduit par un état de non-réactivité à l'antigène, ainsi que par une diminution de la sécrétion de cytokines et de leur prolifération<sup>93,102,109</sup>. De plus, la délétion clonale en périphérie des lymphocytes T auto-réactifs peut être induite par des cellules extra-thymiques exprimant AIRE (eTAC) présentes dans les ganglions et la rate<sup>88,110</sup>.

Tel que vu à la section 1.3.1.1.2 (page 16), les T<sub>REGS</sub> peuvent être générés dans le thymus durant le processus de sélection négative. Ils peuvent également être induits en périphérie par la conversion de lymphocytes T conventionnels suite à l'expression de Foxp3 lors de l'interaction de leur TCR avec un complexe pCMH en présence d'un co-signal d'inhibition ou en condition tolérogénique<sup>86,102,111-114</sup>. Tandis que les T<sub>REG</sub> naturel, c'est-à-dire formés dans le thymus, sont impliqués dans la tolérisation des lymphocytes T aux antigènes du soi ubiquitaires, ceux induits en périphérie le sont davantage pour les antigènes tissus-spécifiques<sup>86,115</sup>. Les T<sub>REG</sub> jouent un rôle important dans la tolérance périphérique, puisqu'il est estimé qu'environ 4% des lymphocytes T conventionnels seraient contrôlés par ces cellules<sup>93,116</sup>. Bien que les mécanismes immunosuppresseurs des T<sub>REGS</sub> soient encore mal compris, plusieurs sont proposés, tels que la

perturbation de l'interaction entre les DC et les lymphocytes T dans les OLS<sup>117</sup>, la sécrétion de cytokines immunosuppressives<sup>118</sup>, la séquestration de molécules de co-stimulation et l'interaction directe avec les lymphocytes T (**Figure 1.5b**)<sup>88,93</sup>.

En résumé, la reconnaissance antigénique en condition physiologique est un processus permettant la maturation et l'éducation des lymphocytes T dans le thymus, de même que l'homéostasie des lymphocytes T naïfs en périphérie. De plus, la rencontre d'antigènes du soi dans un contexte non-inflammatoire peut mener à l'élimination ou l'inactivation de lymphocytes T auto-réactifs par des mécanismes encore largement incompris. Ainsi, la reconnaissance antigénique en condition physiologique permet la création d'un répertoire de lymphocytes T naïfs non-réactif au soi, mais prêt à s'activer lors de la rencontre d'un stimulus immunogène.

### **1.3.2 La reconnaissance antigénique en condition pathologique : les réponses immunitaires de type 1**

La reconnaissance antigénique en condition pathogénique est un processus complexe qui implique plusieurs composants du système immunitaire qui vont s'activer et sécréter des cytokines différentes selon le type d'insulte immunologique. La réponse immunitaire adaptative est divisée en trois étapes, soit la stimulation initiale et l'expansion, la résolution et la contraction, puis la mémoire immunitaire<sup>119</sup>. Dans les prochaines sections, il sera question des différentes phases de la réponse immunitaire adaptative. Nous n'aborderons que la réponse médiée par les lymphocytes T CD8 contre les pathogènes intracellulaires et les cellules cancéreuses, c'est-à-dire les réponses immunitaires de type 1. De plus, bien que les cellules CD4 jouent un rôle important dans la réponse immunitaire, elles ne seront mentionnées que dans un contexte d'aide aux CD8.

#### **1.3.2.1 L'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques**

Les lymphocytes T naïfs reconnaissant spécifiquement un antigène ont une fréquence très peu élevée, estimée à environ 0,8-10 et 0,9-90 cellules par million pour les lymphocytes CD4 et CD8 naïfs, respectivement<sup>120,121</sup>. La mise en place de lieux de rencontre des lymphocytes T avec les cellules présentatrices d'antigènes est donc cruciale : ce sont les OLS. Ces derniers sont donc très importants en condition physiologique pour l'homéostasie des lymphocytes T,

mais également pour les réponses immunitaires en conditions pathologiques. L'activation des lymphocytes T doit passer par: 1) l'interaction du TCR avec le complexe pCMH, 2) la réception de signaux secondaires donnés par les molécules de co-stimulation et 3) les cytokines<sup>122,123</sup>. Parmi les différents types de cellules présentatrices d'antigènes, les DC représentent le type cellulaire pouvant le mieux activer les lymphocytes T puisqu'elles sont en mesure de leur fournir tous les signaux nécessaires à leur activation, en plus d'être capables de participer aux réponses immunitaires dirigées contre un vaste répertoire de pathogènes<sup>121</sup>.

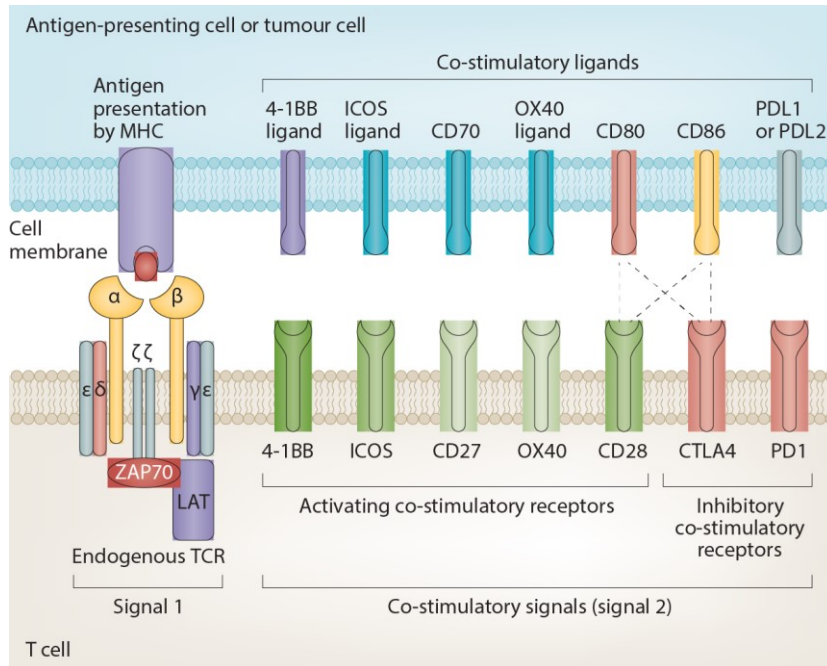
Les DC immatures localisées dans les tissus scannent et intègrent des signaux leur permettant de détecter des insultes immunologiques. La stimulation des récepteurs TLR, les traumatismes mécaniques, la nécrose et les signaux inflammatoires représentent tous des signaux qui vont permettre l'activation et la maturation des DC<sup>97</sup>. Le processus de maturation des DC induit l'activation d'un programme transcriptionnel et métabolique qui permet leur migration vers les ganglions afin d'activer les lymphocytes T<sup>124</sup>. Durant leur maturation, les DC vont cesser d'échantillonner l'environnement afin de préserver les antigènes étant présentés à leur surface cellulaire au moment de leur activation<sup>97</sup>. De plus, elles vont exprimer, à leur surface cellulaire, plusieurs molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T, en plus d'augmenter l'expression de leurs molécules du CMH II. Finalement, elles vont sécréter des cytokines permettant l'activation des lymphocytes T, tel que l'IL-12 et les IFN de type I, qui jouent un rôle particulièrement important dans les réponses immunitaires de type 1<sup>121,124-126</sup>.

### **1.3.2.2 Les réponses immunitaires générées par les lymphocytes T**

#### **1.3.2.2.1 L'activation des lymphocytes T CD8**

La reconnaissance antigénique par les lymphocytes T CD8 en contexte inflammatoire permet leur activation et leur différenciation en lymphocyte T dits cytotoxiques (CTL), qui représentent la majorité des cellules en prolifération, mais également en précurseurs de lymphocytes T mémoires ( $T_{MEM}$ )<sup>124</sup>. On estime que suite à la stimulation initiale, la taille du répertoire de lymphocytes T spécifique à un antigène peut devenir de 50 000 à 500 000 fois plus grand que sa taille initiale, permettant ainsi une réponse de masse face à l'insulte immunologique<sup>121,124</sup>. D'ailleurs, le degré d'expansion des lymphocytes T et donc, leur niveau de réponse à un antigène, est largement dépendant de la taille initiale du répertoire de

lymphocytes T naïf<sup>121,127,128</sup>. Les lymphocytes T possédant un TCR reconnaissant le bon complexe pCMH requièrent, pour s'activer adéquatement, l'activation de voies de signalisation *via* les molécules de co-stimulation. Bien qu'il existe plusieurs molécules de co-stimulation, telles que 4-1BB, CD27 et OX-40, l'interaction entre CD28, exprimé de façon constitutive sur les lymphocytes T, et CD80/86, sur les DC matures, est la plus importante (**Figure 1.4**)<sup>124</sup>. En plus de favoriser la prolifération cellulaire et d'influencer la survie et le métabolisme des lymphocytes T, cette interaction permet la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T. Cet important facteur de croissance dicte l'amplitude de la réponse immunitaire et la différenciation des CTL, en plus de favoriser les réponses immunitaires primaires et la génération des cellules mémoires<sup>121,129-133</sup>. Les CTL expriment également des molécules de co-répressions telles que l'antigène-4 de lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4) et le récepteur-1 de mort cellulaire programmée (PD-1) (**Figure 1.4**). CTLA-4 est exprimé à la surface des lymphocytes T 24 à 48 heures après le début de la stimulation antigénique et permet d'inhiber les réponses des CTL grâce à la séquestration de CD80/86<sup>129,134</sup>. PD-1 séquestre pour sa part des phosphatases cytoplasmiques, inhibant ainsi la transduction des signaux positifs d'activation, résultant également en l'inhibition des réponses par les CTL<sup>135</sup>. Ces molécules, dont l'expression est transitoire, sont donc très importantes pour le contrôle de la réponse immunitaire et permettent de limiter l'expansion des lymphocytes T suite à leur activation<sup>121</sup>. Finalement, la sécrétion d'IL-12 par les DC permet la différenciation des lymphocytes T CD8 grâce à l'induction de l'expression du facteur de transcription T-bet<sup>136-138</sup>. Ce faisant, les CTL deviennent polyfonctionnels, c'est-à-dire qu'ils expriment plusieurs caractéristiques effectrices, telles que la production et la dégranulation de molécules cytotoxiques (granzyme B et perforine), de même que la sécrétion de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, lymphotoxine et MIP)<sup>119,124,139</sup>. Les CTL peuvent alors entrer dans la circulation et migrer vers les tissus affectés pour éliminer leurs cibles par apoptose. Pour ce faire, les CTL induisent l'apoptose des cellules cibles *via* l'induction de caspases, grâce à la liaison de FasL sur les cellules cibles par Fas sur les lymphocytes T, ou au système perforine/granzyme<sup>126,140</sup>.



**Figure 1.4. Le récepteur et les molécules co-stimultrices d'activation ou d'inhibition des lymphocytes T.** L'expression endogène du TCR inclue une paire de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui sont associées avec des chaînes  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\gamma$  et la chaîne  $\zeta$  permettant la signalisation. Les voies les plus courantes d'activation et d'inhibition des lymphocytes T par les molécules de co-

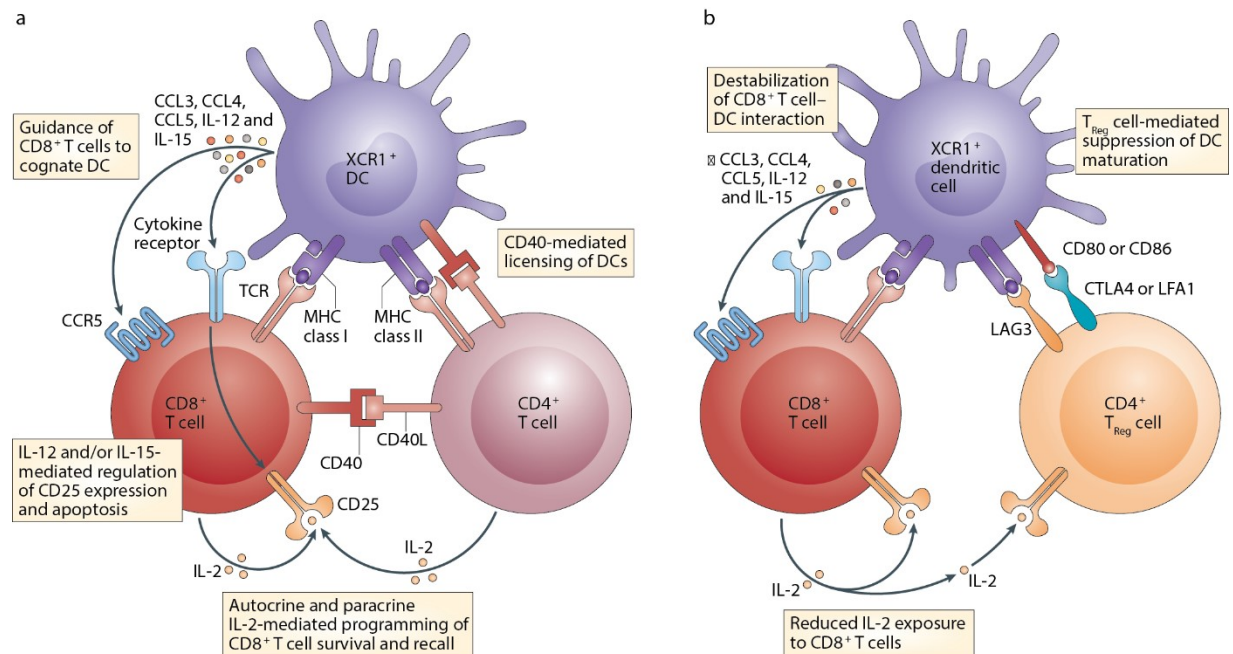
stimulation sont illustrées Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (Fesnak AD, June CH, Levine BL), copyright (2016)<sup>141</sup>.

La polyfonctionnalité des CTL est directement corrélée avec leur avidité fonctionnelle, une mesure *in vitro* de la force de l'interaction entre le CTL et la cellule présentant l'antigène; plus la dose d'antigène requise pour déclencher une réponse immunitaire est faible, plus l'avidité fonctionnelle est haute<sup>142</sup>. Plusieurs paramètres influencent cette interaction entre les CTL et leur cible, notamment l'efficacité de la présentation antigénique, l'affinité du peptide pour les molécules du CMH I, la stabilité du complexe pCMH, l'abondance de l'antigène sur les cellules présentatrices d'antigènes, la fréquence des lymphocytes T dans le répertoire naïf<sup>143</sup>, l'affinité du TCR pour le complexe pCMH, l'abondance des TCR sur le lymphocyte T, l'organisation et l'abondance des molécules co-réceptrices et co-stimultrices à la surface cellulaire<sup>121,142,144</sup>. Bien que leur contribution individuelle soit encore mal comprise, globalement, ces facteurs permettent de dicter l'immunogénicité des antigènes, c'est-à-dire leur capacité à induire de fortes réponses immunitaires.

### 1.3.2.2.2 L'aide à la réponse par les lymphocytes T CD4

Selon les signaux qu'ils vont recevoir de la part des DC, les lymphocytes T CD4 peuvent se différencier en sous-types cellulaires, notamment en T<sub>REG</sub> et en Thelper (T<sub>H</sub>). Représentant

une classe en expansion, les diverses population de  $T_H$  sont impliquées dans les réponses contre les virus et les bactéries intracellulaires ( $T_H1$ ), contre les parasites et dans les réponses humorales ( $T_H2$ ) et contre les réponses dans les muqueuses ( $T_H17$ )<sup>121,145,146</sup>. La polarisation des lymphocytes T CD4 en l'une ou l'autre des sous-catégories est influencée par la nature de l'interaction entre le TCR et le pCMH, la nature des signaux fournis par les molécules de co-stimulation, ainsi que par la présence de cytokines dans le milieu extracellulaire. Particulièrement, les cytokines IL-12, IFN- $\gamma$  et IFN de type I sécrétées par les cellules dendritiques favorisent la différenciation des lymphocytes T CD4 en  $T_H1$ <sup>145,147,148</sup>. Les  $T_H1$  devenues effectrices sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-2<sup>121,126,148</sup> et agissent comme aide pour les réponses cytotoxiques générées par les CTL. Plusieurs modèles d'aide à la réponse CTL sont proposés, mais le modèle de « licenciement des DC » est le mieux caractérisé et accepté. Dans ce modèle, les lymphocytes T CD4 permettent l'activation et la maturation des DC grâce à l'interaction de CD40 avec CD40L, permettant ainsi aux DC de recruter et activer les lymphocytes T CD8 (**Figure 1.5a**)<sup>136</sup>.



**Figure 1.5. L'aide des lymphocytes T CD4 aux lymphocytes T CD8.** (A) Les lymphocytes T CD4 activés interagissent avec les DC par un mécanisme dépendant de CD40. Les DC ainsi licenciés expriment davantage les molécules du CMH et de co-stimulation et peuvent recruter les lymphocytes T CD8 par la sécrétion de cytokines et de chimiokines. (B) Les  $T_{REG}$  peuvent également moduler les réponses CD8 en réprimant l'état de maturation des DC. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Review Immunology (Laidlaw BJ, Craft JE et Kaech SM), copyright (2016)<sup>119</sup>

La sécrétion d'IL-12 par les DC activées par les lymphocytes T CD4 favorise l'expression du récepteur de l'IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) sur les lymphocytes T CD8, permettant l'inhibition du ligand induisant l'apoptose lié au TNF (TRAIL) et prévenant la mort apoptotique des lymphocytes T CD8 lors de la rencontre subséquente du pathogène ayant provoqué leur activation. De plus, les DC qui sont activées par les lymphocytes T CD4 sécrètent de l'IL-15, autre cytokine favorisant la répression de l'expression de TRAIL<sup>136</sup>. Ainsi, les lymphocytes T CD8 activés sans aide des lymphocytes T CD4 ont un faible taux de survie à long terme et sont moins efficaces lors de réponses immunitaires secondaires<sup>119,136,149,150</sup>. Celle-ci est donc nécessaire pour la génération d'une réponse mémoire fonctionnelle mais sa nécessité pour l'induction d'une réponse primaire fonctionnelle est moins claire<sup>151-155</sup>.

### **1.3.2.3 La contraction de la réponse immunitaire et la mémoire immunologique**

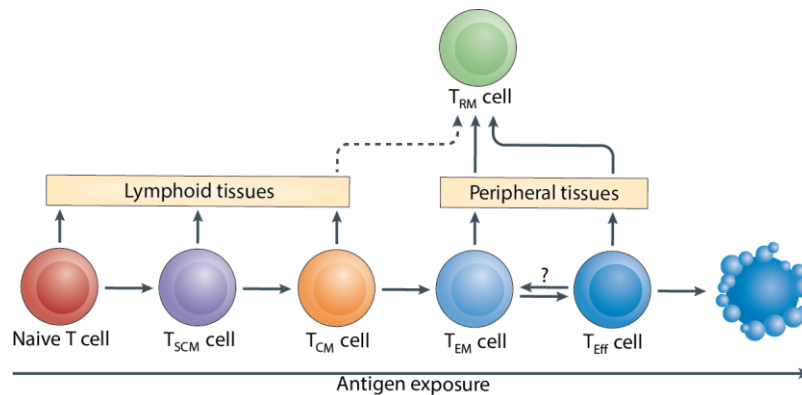
Suite à la résolution de l'infection, une contraction du répertoire de lymphocytes T spécifiques aux antigènes permet de maintenir l'homéostasie des lymphocytes T et de limiter l'exposition des tissus à un environnement inflammatoire. Ainsi, tandis que plus de 90% des lymphocytes T sont éliminés par un programme intrinsèque d'apoptose (mort cellulaire induite par activation; AICD)<sup>156</sup>, une partie des cellules persistent sous la forme de lymphocytes T<sub>MEM</sub><sup>119,126,157</sup>.

Le passage d'un lymphocyte T de l'état naïf à l'état effecteur entraîne des modifications épigénétiques majeures qui ont un impact important dans son programme transcriptionnel et qui vont persister bien après la résolution de l'infection, leur conférant ainsi la mémoire immunologique<sup>158,159</sup>. Ainsi, les T<sub>MEM</sub> survivent plus longtemps et prolifèrent plus rapidement et de façon plus robuste suite à la rencontre de l'antigène ayant provoqué leur activation initiale<sup>119,121</sup>. De plus, les T<sub>MEM</sub> sont capables de survivre en périphérie sans stimulation constante par le TCR, mais dépendent de l'intégration de signaux *via* l'IL-7 et l'IL-15 pour leur survie et leur prolifération basale homéostatique<sup>121,157,160</sup>.

Les T<sub>MEM</sub> sont divisés en plusieurs sous-catégories, selon leur fonction effectrice, le type de cytokines qu'ils sécrètent, l'expression des marqueurs de surface, leur capacité de migration et leur localisation<sup>160-163</sup>. Les lymphocytes T cellule souche mémoire (T<sub>SCM</sub>) ont un phénotype



similaire à celui des lymphocytes T naïfs, bien qu'ils aient déjà été activés par les cellules présentatrices d'antigènes. Ces cellules, localisées dans les OLS, sont capables d'auto-renouvellement et peuvent générer d'autres types plus différenciés de  $T_{MEM}$  : les lymphocyte T mémoire centrale ( $T_{CM}$ ) et les lymphocyte T effecteur mémoire ( $T_{EM}$ )<sup>160,163,164</sup>. Les  $T_{CM}$  sont localisés dans les OLS et peuvent proliférer rapidement lors de de réponses immunitaires secondaires. Ils produisent de l'IL-2 et diverses cytokines effectrices et, comme les  $T_{SMC}$ , ont un potentiel d'auto-renouvellement. Par opposition, les  $T_{EM}$  sont capables de migration et peuvent circuler dans les tissus extra-lymphoïdes. Ces cellules répondent plus rapidement que les  $T_{CM}$  au stimulus secondaire par la sécrétion de cytokines effectrices, mais ont une capacité de prolifération limitée<sup>161,163,165</sup>. Finalement, les lymphocytes T résidents dans les muqueuses ( $T_{RM}$ ) sont générés par les  $T_{EM}$  ou les CTL résidants dans les tissus. Malgré leur incapacité à migrer hors des tissus, ces cellules sont capables de rapidement déclencher un réponse effectrice, leur conférant un rôle très important dans les réactions immunitaires secondaires dans les tissus (Figure 1.6)<sup>160,166,167</sup>.



**Figure 1.6. Schématisation de la différenciation des lymphocytes T mémoires circulants ou résidents dans les tissus.** La différenciation progressive des trois principaux sous-ensembles –  $T_{SCM}$ ,  $T_{CM}$  et  $T_{EM}$  – depuis un lymphocyte T naïf, est démontré en relation avec

l'importance de leur exposition à l'antigène. Les  $T_{EFF}$  représentent des cellules terminalement différenciées et la mort cellulaire est l'un des résultats d'une plus grande exposition à l'antigène et à la prolifération. Les  $T_{RM}$  sont dans les tissus périphériques et peuvent dériver de  $T_{EM}$  ou  $T_{EFF}$  qui migrent à ces sites par des facteurs spécifiques à ces tissus. Il est également possible que les  $T_{CM}$  se différencient en  $T_{RM}$  dans les tissus lymphoïdes (flèche pointillée). Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology (Farber DL, Yudanin NA et Restifo NP), copyright (2013)<sup>160</sup>

En résumé, la reconnaissance antigénique en condition pathologique est un processus complexe qui requiert l'intervention de plusieurs composants du système immunitaire. Ainsi,



dans un contexte inflammatoire, les lymphocytes T CD8 qui sont activés dans les OLS par les DC et avec l'aide des lymphocytes T CD4, acquièrent des compétences cytotoxiques leur permettant de reconnaître et d'éliminer les pathogènes afin d'éviter leur dissémination dans l'organisme. De plus, ils peuvent générer différents types de cellules mémoires qui sont capables de répondre plus rapidement et plus efficacement lors de la rencontre subséquente de l'antigène ayant initialement provoqué leur activation.

### **1.3.3 La reconnaissance antigénique dans le cancer**

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par l'accumulation d'altérations génétiques qui permettent l'acquisition de fonctions favorisant leur survie, leur prolifération et leur propagation<sup>168,169</sup> et qui peuvent mener à la génération d'antigènes présentés uniquement sur les cellules cancéreuses. Ainsi, les concepts de reconnaissance antigénique expliqués jusqu'à présents sont également applicables en contexte tumoral.

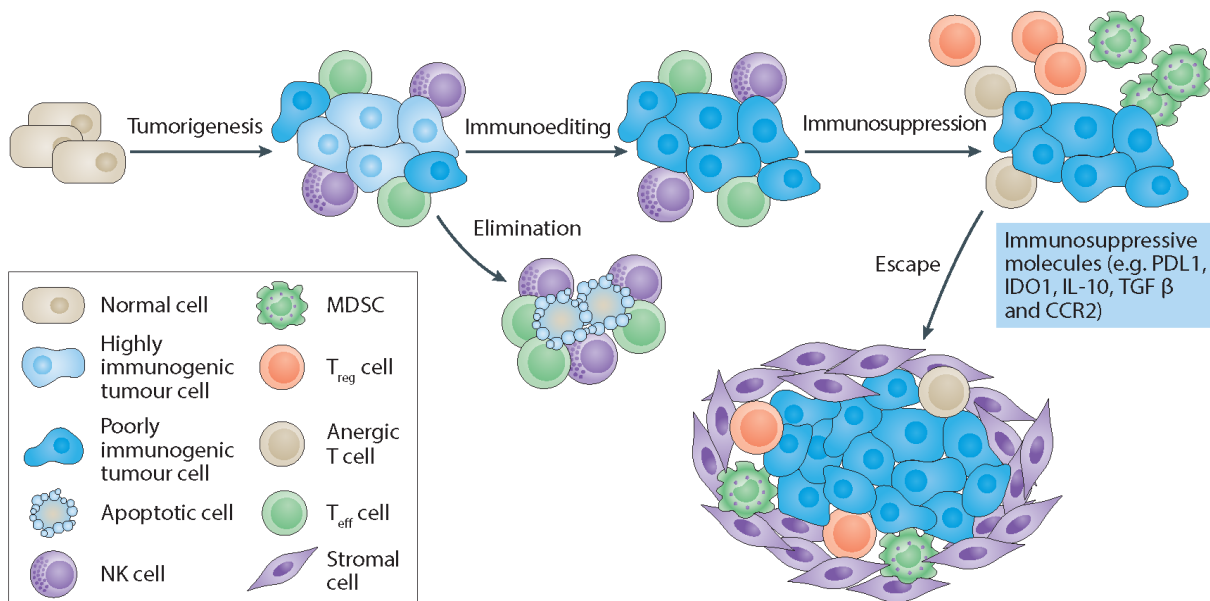
Presque toutes les tumeurs solides, qui peuvent être perçues comme des organes à part entière, sont infiltrées à différents degrés par des cellules du système immunitaire, témoignant de tentatives d'élimination des cellules cancéreuses<sup>168,170,171</sup>. De fait, chez l'humain comme chez la souris, les individus atteints d'immunodéficiences sévères ont une plus grande propension à développer un cancer que les individus sains<sup>168</sup>. De plus, des CTL reconnaissant spécifiquement des complexes pCMH cancer-spécifiques ont été identifiés à maintes reprises<sup>169,171,172</sup>. Finalement, l'introduction de « l'immunoscore » par le groupe de Jérôme Galon a permis de caractériser le degré d'infiltration des différentes cellules du système immunitaire dans les tumeurs. Ce faisant, ces travaux ont mis en évidence que le contexte immunitaire, c'est-à-dire la nature, l'abondance et la localisation des cellules immunitaires, représente un puissant outil pronostique pour les patients atteints de cancer<sup>173-175</sup>. Les cellules cancéreuses, ainsi sujettes à une surveillance immunitaire, devraient donc être éliminées avant leur dissémination dans l'organisme<sup>168</sup>. Néanmoins, une mobilisation immunitaire suffisante menant au développement de réponses immunitaires protectrices n'a pas toujours lieu. D'ailleurs, cette inactivité du système immunitaire envers les cellules cancéreuses découle d'une résistance adaptative localisée dans l'environnement tumoral puisque les individus atteints d'un cancer ne sont pas davantage sujets à des infections<sup>176</sup>.

### 1.3.3.1 La tolérance immunologique des cellules cancéreuses

Le processus de reconnaissance antigénique sur des cellules cancéreuses est très similaire à celui observé en contexte d'infection par des pathogènes. Dans le cas des cellules cancéreuses, la mort cellulaire est le principal mécanisme de dispersion des antigènes, de par le cycle cancer-immunité. Ce cycle débute donc avec la capture d'antigènes dans l'environnement tumoral et l'activation des DC par les cytokines qui y sont présentes et autres facteurs relâchés par les cellules mourantes. Les DC migrent alors vers les ganglions pour activer les lymphocytes T, qui vont à leur tour migrer vers les tumeurs pour y éliminer les cellules cancéreuses. Ce faisant, de nouveaux antigènes sont relâchés dans l'environnement tumoral, favorisant la continuation du cycle cancer-immunité<sup>169</sup>. Néanmoins, la reconnaissance antigénique menant à l'élimination des cellules cancéreuses n'est pas toujours observée. Deux hypothèses, non-mutuellement exclusives, sont favorisées pour expliquer ce phénomène : l'évasion des cellules cancéreuses et la suppression des réponses immunitaires. D'une part, un concept, connu sous le nom d'immuno-édition, a été proposé au début des années 2000 par l'équipe de Schreiber<sup>177</sup> et propose que la pression sélective induite par les cellules du système immunitaire sur les cellules cancéreuses favorise l'émergence de clones qui sont invisibles aux yeux des cellules du système immunitaire<sup>176,178-180</sup>. De plus, plusieurs études ont démontré que divers éléments de la voie de la présentation antigénique sont altérés, voire réprimés dans certains types de cancers<sup>180-182</sup>. Cependant, malgré de nombreuses évidences dans la littérature, l'hypothèse de l'évasion des cellules cancéreuses n'est probablement pas le seul mécanisme permettant d'expliquer la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, plusieurs études démontrant une certaine efficacité pour les thérapies visant à reconditionner les cellules du système immunitaire (abordées à la section 1.4.2, page 33)<sup>169,176,183</sup>, suggèrent que l'environnement tumoral représente un milieu hostile et non-permissif pour le développement de réponses immunitaires (**Figure 1.7**).

Le système immunitaire possède des fonctions diamétralement opposées dans le contrôle du développement des tumeurs. D'une part, la présence de cellules du système immunitaire dans l'environnement tumoral permet la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses. D'autre part, celui-ci est directement impliqué dans le processus de carcinogénèse, que ce soit par des mécanismes favorisant le développement des cellules cancéreuses ou par des

mécanismes induisant l'inactivation des cellules du système immunitaires<sup>168</sup>. De fait, la présence de cellules du système immunitaire inné et adaptatif dans l'environnement tumoral entraîne la sécrétion de diverses molécules destinées à promouvoir leur infiltration, leur croissance, leur survie et leurs fonctions effectrices<sup>184-187</sup>. Néanmoins, ces mêmes facteurs peuvent agir comme mutagène sur les cellules cancéreuses et favoriser le développement des tumeurs, en plus d'être exploités afin de limiter les interventions du système immunitaire<sup>185</sup>.



**Figure 1.7. Les mécanismes acquis de tolérance immunologique par les cellules cancéreuses.** Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (Yarchoan M, Johnson BA 3rd, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM), copyright (2017)<sup>42</sup>

Ainsi, le cycle immunité-cancer peut être altéré par plusieurs événements favorisant l'évasion des cellules cancéreuses et la suppression des réponses immunitaires, que ce soit parce que les antigènes ne sont pas perçus et capturés convenablement par les DC, parce que ces dernières acquièrent un phénotype tolérogène, parce que les antigènes sont perçus comme du « soi » et qu'ils induisent des mécanismes de tolérance *via* les T<sub>REGS</sub>, parce que les DC et les lymphocytes T sont incapables de migrer de ou vers la tumeur à cause de barrières physiques ou parce que des éléments immunosuppresseurs sont présents dans l'environnement tumoral<sup>169</sup>.

### 1.3.3.2 L'épuisement des lymphocytes T

En situation d'infection chronique ou de cancer, une exposition prolongée à un antigène favorise un état dysfonctionnel des lymphocytes T. L'exposition à de grandes quantités d'antigènes, à un état inflammatoire prolongé et l'absence d'aide des lymphocytes T CD4 sont tous des facteurs qui contribuent à l'épuisement des lymphocytes T CD8 et qui vont dicter la sévérité de leur dysfonction<sup>98,188</sup>. Ce phénomène représente donc un facteur important dans l'évasion tumorale<sup>189</sup> et est caractérisé par la perte successive de la sécrétion d'IL-2, de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$ , de la prolifération et des capacités cytotoxiques<sup>98,188-190</sup>. L'induction de l'état d'épuisement peut passer par divers mécanismes qui utilisent les molécules de surface et les facteurs solubles fournis par les cellules régulatrices<sup>188</sup>, tel que vu à la section 1.3.2 (page 20). Par exemple, l'expression de T-bet est inhibée dans les CTL en état d'épuisement, ce qui empêche la répression du gène codant pour PD-1, provoquant ainsi une stimulation prolongée de ce co-récepteur d'inhibition<sup>98,157,188,191</sup>. Ainsi, ces cellules expriment plusieurs co-récepteurs d'inhibition, tels que PD-1, LAG-3 (gène d'activation des lymphocytes-3), CD244, CD160, CTLA-4, BTLA (atténuateur de lymphocytes T et B) et TIM-3 (Protéine de cellule T contenant un domaine immunoglobuline et mucine-3)<sup>98,188</sup>. Les ligands de ces co-récepteurs d'inhibition peuvent être exprimés par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou par les cellules immunitaires suppressives présentes dans l'environnement tumoral, telles que les cellule progénitrices myéloïde suppressives (MDSC), les T<sub>REG</sub> et macrophages associés aux tumeurs (TAM)<sup>186,192-195</sup>. Les cellules immunitaires suppressives peuvent également sécréter des facteurs tels que l'IL-6, l'IL-10, le TGF- $\beta$ , le facteur de croissance de la vasculature endothéliale (VEGF) et le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF), qui altèrent la différenciation, la maturation et la fonction des DC et favorisent la répression des fonctions des lymphocytes T<sup>98,180,188,196</sup>. De façon indirecte, les cellules immunitaires suppressives peuvent également entraîner la dysfonction des lymphocytes T par l'activation des macrophages dans l'environnement tumoral, qui vont à leur tour sécréter l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Cette enzyme est responsable de la dégradation du tryptophane extracellulaire et, ce faisant, favorise la génération d'un sous-produit métabolique toxique pour les lymphocytes T (**Figure 1.7**)<sup>188,197</sup>. Bien que les lymphocytes T en état d'épuisement présentent des altérations moléculaires telles que la dérégulation des gènes de chimiotaxisme, de migration et de

métabolisme et ceux codant pour les molécules d'adhésion et les co-récepteurs, l'induction de cette dysfonction est un processus réversible<sup>189</sup>. En effet, l'inhibition de co-récepteurs d'inhibition, seuls<sup>190</sup> ou en combinaison<sup>198,199</sup>, permet de résorber l'état d'épuisement, tout comme l'ajout d'IL-2<sup>200</sup> et la diminution de la charge antigénique à laquelle les lymphocytes T sont exposés<sup>201</sup>.

En résumé, la reconnaissance antigénique joue un rôle crucial dans les fonctions des lymphocytes T, au niveau de leur éducation, de leur maturation et de leur maintien homéostatique, de même qu'en contexte pathologique. Cependant, la complexité des mécanismes entourant cette reconnaissance antigénique, particulièrement en situation de cancer, rend difficile les interventions thérapeutiques visant à stimuler des réponses immunitaires et leur compréhension est d'une importance capitale pour le développement d'immunothérapies contre le cancer.

## **1.4 L'immunothérapie du cancer**

L'immunothérapie du cancer peut se définir comme étant le processus par lequel les cellules du système immunitaire sont directement ou indirectement manipulées dans le but d'initier ou d'augmenter leur potentiel anti-tumoral. L'idée d'utiliser ce type de thérapie a été proposée il y a plusieurs décennies, période durant laquelle les pionniers du domaine ont défendu l'idée que le traitement du cancer par le système immunitaire est non seulement possible, mais qu'il est désirable.

Le transfert allogénique de cellules hématopoïétique (AHCT) représente une forme de traitement couramment utilisé en clinique pour le traitement de cancers hématologiques, dans lequel des cellules hématopoïétiques et des lymphocytes T non-spécifiques à un antigène d'un donneur sain sont transplantés à un receveur atteint de cancer<sup>202</sup>. Les premiers rapports faisant état de l'efficacité de l'AHCT datent des années 1950 et ont été confirmés à maintes reprises depuis. L'élimination des cellules leucémiques après un AHCT est possible grâce à une réaction du greffon contre les leucémies (GVL), laquelle est largement dépendante de la reconnaissance antigénique chez le receveur par les lymphocytes T du donneur, tel que démontré par le fait que la déplétion de ces cellules dans le greffon est associée à un plus haut taux de rechute<sup>203-205</sup>. Les résultats bénéfiques observés chez les individus atteints de cancer obtenus suite à un AHCT ont

permis de démontrer que les cellules du système immunitaire sont en mesure de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses<sup>206</sup>. Une revue de littérature portant sur l'AHCT, de même que sur le transfert adoptif de cellules T spécifiques aux antigènes (Vu à la section 1.4.3, page 35), est incluse dans le chapitre 2 de cette thèse.

L'utilisation de cellules du système immunitaire pour le traitement du cancer comporte plusieurs avantages. D'abord, les cellules du système immunitaire sont capables de générer des réponses anti-tumorales contre le « soi-altéré » présenté par les cellules cancéreuses. Ensuite, les essais cliniques effectués jusqu'à présent démontrent que les immunothérapies sont généralement sécuritaires et comportent peu d'effets secondaires<sup>169</sup>. Finalement, contrairement à la chimiothérapie et la radiothérapie, les cellules du système immunitaire sont capables de reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses en prolifération de même que celles qui sont en état de sénescence<sup>207</sup>. Aujourd'hui, plusieurs types d'immunothérapies sont à l'étude et jouent un rôle important dans l'arsenal de traitements utilisés pour la lutte contre le cancer, aux côtés des approches classiques de chimiothérapie, de radiothérapie et de chirurgie.

Les différentes approches visant à stimuler des réponses immunitaires contre les cellules cancéreuses peuvent être utilisées sur n'importe quel type de cellule du système immunitaire, en plus de cibler un vaste répertoire de molécules et cytokines impliquées dans les réponses immunitaires. Celles-ci peuvent être classifiées selon leur mécanisme d'action, soit les thérapies immuno-modulatrices, la vaccination et le transfert adoptif de lymphocytes T (ACT). Cette section consiste donc en une revue de littérature portant sur les principaux types d'immunothérapies présentement en développement, leur fonctionnement et les défis qu'elles comportent.

### **1.4.1 Thérapies visant le microenvironnement tumoral**

Contrairement aux cancers hématologiques, les tumeurs solides possèdent leur propre microenvironnement tumoral qui peut être hautement immunosuppresseur, de par la présence de cellules immunitaires suppressives et de cytokines immunosuppressives<sup>208</sup>. Les immunothérapies visant l'environnement tumoral ont donc comme objectif de convertir cet environnement immunosuppresseur en un environnement immunogène, favorable aux réponses

immunitaires. Celles-ci sont utilisées seules ou en combinaison avec les anticorps monoclonaux ou les ACT, qui seront abordés ultérieurement.

Tel que mentionné à la section 1.3.3 (page 27), l'environnement tumoral est peuplé de cellules immunosuppressives, tel que les MDSC, les T<sub>REG</sub> ainsi que les TAM. Plusieurs études ont démontré que l'élimination de ces cellules dans le microenvironnement tumoral permet d'augmenter les réponses anti-tumorales endogènes<sup>192-194</sup>. De plus, l'administration de chimiothérapie ou de radiothérapie avant un ACT facilite l'implantation du greffon<sup>209</sup> en permettant de renforcer le cycle cancer-immunité *via* un processus de mort cellulaire immunologique<sup>210</sup> et par la déplétion des cellules immunitaires suppressives<sup>208,211,212</sup>. Les cytokines sécrétées par les cellules immunosuppressives sont également des cibles intéressantes pour l'immunothérapie du cancer. En effet, des résultats préliminaires ont démontré une certaine efficacité pour les thérapies visant à supprimer les réponses dépendantes de l'IL-10, du TGF- $\beta$  ou d'IDO<sup>208</sup>. De plus, les résultats d'essais cliniques visant l'inhibition d'IDO en combinaison avec une thérapie utilisant un anticorps monoclonal se sont avérés plutôt encourageants<sup>213</sup>. Finalement, la conversion d'un environnement immunosuppressif en un environnement immunogène peut être possible grâce à l'administration de cytokines jouant un rôle dans l'activation des lymphocytes T, tel que l'IL-2, l'IL-7, l'IL-12 et l'IL-15. Bien que certaines de ces cytokines soient utilisées en combinaison avec l'ACT, leur injection systémique peut entraîner de la toxicité. Ainsi, des systèmes permettant la sécrétion locale de ces cytokines, par exemple *via* des cellules modifiées génétiquement, sont en cours de développement<sup>208,214</sup>. Davantage d'études seront toutefois nécessaires afin de comprendre comment mieux cibler ces molécules pour un usage thérapeutique<sup>208</sup>.

## **1.4.2 L'immuno-modulation par les anticorps monoclonaux**

Ciblant les cellules du système immunitaire, particulièrement les lymphocytes T, l'immuno-modulation peut être utilisée pour le traitement de n'importe quel type de cancer, bien que les réponses cliniques soient plus importantes dans certains types tumoraux<sup>215</sup>. En plus de permettre la régression, voir l'élimination complète des cellules cancéreuses, ces thérapies favorisent l'induction d'une mémoire immunologique<sup>215-217</sup>. Finalement, les effets secondaires liés à ce type de thérapie regroupent des événements immunologiques qui sont facilement

gérables en clinique et qui sont généralement réversibles<sup>214,215,218</sup>. La modulation immunologique par des anticorps monoclonaux permet de bloquer ou d'activer respectivement les molécules de co-répression (CTLA-4, l'axe PD-1/PD-L1, LAG-3 et TIM-3) ou de co-stimulation (4-1BB, OX40, CD40 et GITR; protéine associée au récepteur du TNF induit par les glucocorticoïdes)<sup>98,121,214</sup>.

L'Ipilimumab est un anticorps permettant de bloquer l'interaction entre CTLA-4 et son ligand pour permettre le rétablissement des fonctions des lymphocytes T en état d'épuisement<sup>169</sup>. Des essais cliniques démontrant la capacité de cet anticorps à prolonger la survie des patients atteints du mélanome métastatique<sup>219</sup> ont permis à l'Ipilimumab d'être le premier anticorps monoclonal approuvé par la FDA (agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) pour le traitement de ce type de cancer<sup>98,215</sup>. D'autre part, puisque le ligand de PD-1 (PD-L1) est exprimé par 20 à 50% des cancers, l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant cet axe peut également s'avérer très intéressant pour le traitement du cancer<sup>169</sup>. Ainsi, deux anticorps anti-PD-1 (Pembrolizumab et Nivolumab) ont été approuvés par la FDA en 2014 pour le traitement du mélanome<sup>220</sup> et du carcinome pulmonaire à petites cellules<sup>221</sup>. Globalement, les approches thérapeutiques ciblant CTLA-4 ou l'axe PD-1/PD-L1 ont démontré des effets bénéfiques pour 20 à 30% des patients atteints d'un mélanome métastatique, d'un cancer du poumon, d'un carcinome rénal ou de certains types de cancer colorectaux<sup>169,216,222</sup>. Ces anticorps sont présentement en cours d'évaluation pour le traitement du carcinome rénal, de l'adénocarcinome pancréatique<sup>215,223,224</sup>, du lymphome Hodgkinien<sup>225</sup>, du cancer de la vessie<sup>226</sup>, de même que dans plusieurs autres types de cancers. Malgré l'observation de réponses cliniques intéressantes suite à l'utilisation de ces anticorps monoclonaux, celle-ci ne demeure toutefois bénéfique qu'à un nombre restreint de patients. Néanmoins, ces résultats ont incité le développement d'anticorps monoclonaux visant d'autres molécules de co-inhibition, tel que LAG-3 et TIM-3, ou des molécules de co-stimulation, tel que GITR, CD40 et OX-40, pour lesquels des essais précliniques ont mis en évidence un potentiel thérapeutique dans plusieurs types de cancers<sup>214,215,227-229</sup>. De façon intéressante, des effets secondaires majeurs ont été notés lors d'essais cliniques pour le traitement du mélanome métastatique humain grâce à un anticorps visant à activer les lymphocytes T *via* 4-1BB<sup>215,230</sup>,



suggérant que les anticorps visant les molécules co-inhibitrices comme CTLA-4 ou PD-1 seraient plus sécuritaires<sup>169</sup>.

Les résultats cliniques obtenus suite au traitement de divers cancers par des anticorps monoclonaux ont permis de mettre en évidence que les lymphocytes T en état d'épuisement dans l'environnement tumoral peuvent être réactivés pour ensuite générer des réponses anti-tumorales. Néanmoins, bien que les réponses anti-tumorales observées lors de ces thérapies soient très prometteuses, il n'en demeure pas moins que l'immuno-modulation par les anticorps monoclonaux n'est pas efficace chez tous les patients, ni dans tous les types de cancers. Plus d'études sont donc requises afin de mieux cibler les patients pouvant bénéficier de ce type de thérapie<sup>215</sup>.

### **1.4.3 Stimulation des lymphocytes T de façon antigène spécifique**

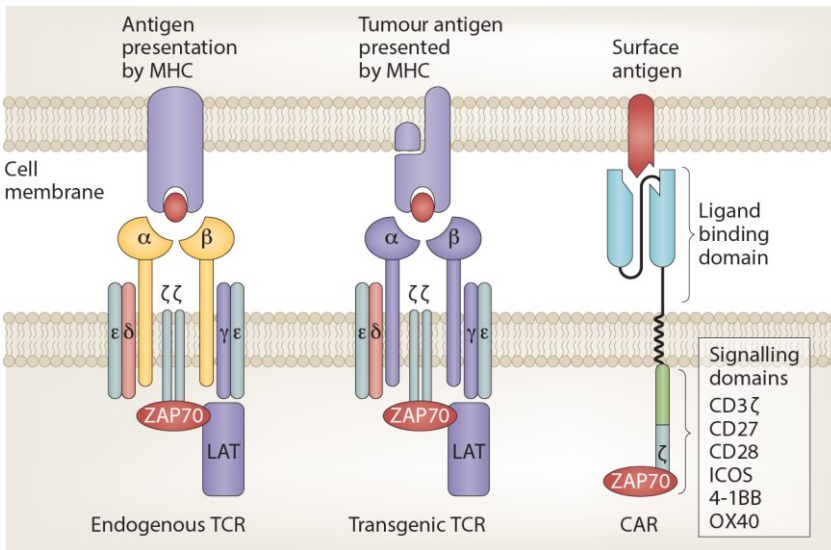
Tel que mentionné précédemment et détaillé dans le chapitre 2, l'AHCT pour le traitement de cancers hématologiques a été le premier type de transfert adoptif de cellules T à être utilisé en pratique clinique courante. Bien que son efficacité soit incontestable, cette thérapie peut entraîner un effet secondaire majeur dans 60% des patients : la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD). En effet, dans l'AHCT, l'utilisation de lymphocytes T non-sélectionnés pour la reconnaissance spécifique d'antigènes présents sur les cellules cancéreuses, peut provoquer la reconnaissance et l'élimination des cellules saines chez le receveur par les cellules du donneur (**Figure 1.9b, page 42**). Ainsi, plusieurs stratégies visant à utiliser des lymphocytes T dirigés spécifiquement contre des antigènes présentés par les cellules cancéreuses sont en développement.

#### **1.4.3.1 Les différents types de thérapies**

##### **1.4.3.1.1 Les lymphocytes T ayant un récepteur d'antigène chimérique**

Les lymphocytes T ayant un récepteur d'antigène chimérique (CAR) sont modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur reconnaissant des antigènes dans un contexte indépendant du CMH. La structure de base des lymphocytes T ayant un CAR (T-CAR) correspond à une protéine de fusion comportant d'une part un domaine intracellulaire de signalisation (CD3 $\zeta$ ) et d'autre part, d'une chaîne unique composé d'un fragment variable d'une

immunoglobuline<sup>141,231</sup>. De plus, afin d'éviter l'induction d'un état anergique dans les T-CAR, des domaines intracellulaires de co-stimulation, tel que 4-1BB ou CD28, sont ajoutés individuellement<sup>141</sup> ou en combinaison, permettant la signalisation en *cis* (Figure 1.8)<sup>215</sup>. Finalement, les générations de T-CAR les plus récentes peuvent également posséder un second gène permettant la sécrétion de cytokines favorisant leur prolifération et leur migration vers les tumeurs, ou permettant de moduler l'environnement tumoral<sup>141,215</sup>. Ainsi, les T-CAR représentent essentiellement des lymphocytes T qui sont en mesure de reconnaître des antigènes à la surface cellulaire comme le feraient des lymphocytes B.



**Figure 1.8. Comparaison de la structure des récepteurs de lymphocyte T générés par ingénierie et des récepteurs d'antigène chimérique.** De façon similaire aux TCR endogènes à gauche, les récepteurs de lymphocytes T générés par ingénierie dépendent du recrutement des molécules de signalisation

intracellulaires pour la transduction du signal et reconnaissent des antigènes dans un contexte de présentation antigénique de classe I ou de classe II. Les récepteurs d'antigène chimérique reconnaissent des antigènes de surface, indépendamment des molécules du CMH et donc, ne sont pas restreint à un type cellulaire. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (Fesnak, A. D., June, C. H., Levine, B. L.), copyright (2016)<sup>141</sup>

Bien que l'avantage principal des T-CAR soit que ces derniers puissent être utilisés dans un contexte indépendant des molécules du CMH présentés par l'individu, l'identification d'antigènes exprimés uniquement sur les cellules cancéreuses est très difficile. De fait, le modèle de T-CAR le plus étudié comporte un domaine de reconnaissance antigénique pour le marqueur de surface CD19, lequel est exprimé de façon ubiquitaire sur les lymphocytes B différenciés, mais qui n'est pas exprimé sur les HSC<sup>232</sup>. Ainsi, bien que les T-CAR dirigés contre CD19

entraînent une aplasie des lymphocytes B, celle-ci est limitée à ce compartiment hématopoïétique et est bien tolérée grâce à l'injection par intraveineuse d'Ig. Les essais cliniques de T-CAR dirigés contre CD19 dans le cadre du traitement des leucémies lymphoïdes aiguës de type B (B-ALL) ont permis de démontrer que 70 à 90% des patients ont bénéficié d'une régression tumorale complète<sup>169,215,233,234</sup>. Néanmoins, leur utilisation pour le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques<sup>214</sup>, du lymphome réfractaire à cellules B<sup>235</sup> et du myélome multiple<sup>236</sup> ont mis en évidence des réponses cliniques encourageantes, mais plus modestes que celles observées pour les B-ALL. De plus, de nouvelles cibles sont présentement à l'étude et certaines sont en phase clinique afin d'élargir le spectre d'utilisation des T-CAR dans les cancers hématopoïétiques, tel que les cancers touchant les lymphocytes B, le myélome multiple et les leucémies myéloïdes aiguës<sup>141,215</sup>.

L'efficacité des T-CAR pour le traitement de tumeurs solides est nettement inférieure à celle des T-CAR utilisés pour les cancers hématologiques, possiblement dû à la présence d'un microenvironnement tumoral suppressif<sup>208,231</sup>. De fait, leur utilisation pour le traitement des tumeurs solides est encore limitée, mais des études précliniques sont en cours afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des antigènes surexprimés sur les cancers du pancréas, de l'ovaire et sur les mésothéliomes. De plus, des études cliniques de phase I utilisant des T-CAR reconnaissant un antigène surexprimé dans le neuroblastome ont permis de démontrer que 42% des patients traités ont bénéficié d'une régression tumorale complète<sup>237</sup>. Ainsi, bien que l'efficacité des T-CAR ait été démontrée à maintes reprises dans le cadre du traitement des B-ALL, leur utilisation pour le traitement d'autres types de cancers nécessite davantage d'investigation. Puisque les cibles à l'étude sont également exprimées dans les tissus sains, il est important d'adresser la problématique des effets spécifiques à la cible mais non-spécifiques à la tumeur qui peuvent être moins bien tolérés que dans le cas de l'aplasie des lymphocytes B induite par les T-CAR dirigés contre CD19. De fait, l'utilisation d'un T-CAR reconnaissant une protéine épidermale a entraîné des toxicités létales chez un patient atteint d'un cancer colorectal, due à l'expression, quoi que très faible, de l'antigène dans les poumons<sup>231,238</sup>.

#### **1.4.3.1.2 Stimulation *in vivo* des lymphocytes T présents dans l'environnement tumoral**

L'utilisation de la vaccination dans un contexte d'immunothérapie du cancer a pour but de stimuler les lymphocytes T *in vivo* afin qu'ils puissent reconnaître et éliminer les cellules

cancéreuses. Ainsi, la vaccination dans un contexte d'immunothérapie est largement thérapeutique plutôt que prophylactique. Néanmoins, deux vaccins sont couramment utilisés de façon prophylactique pour les cancers du foie et du col de l'utérus, lesquels sont souvent induits par le virus de l'hépatite B et le virus du papillome humain, respectivement. Les vaccins thérapeutiques peuvent prendre la forme de vaccins cellulaires qui utilisent les cellules cancéreuses du patient ou une combinaison de plusieurs lignées cellulaires établies de patients ayant le même type de cancer<sup>239-241</sup>. Il est également possible d'utiliser des DC générées *ex vivo* qui vont présenter des d'antigènes préalablement sélectionnés, dans un contexte de CMH de classe I ou de classe II<sup>241,242</sup>. Certains vaccins priorisent l'injection de séquences protéiques ou peptidiques directement dans le patient, généralement en combinaison avec des adjuvants ou des modulateurs immunitaires. D'autres utilisent des séquences nucléotidiques (ADN ou ARN) qui sont acheminés aux cellules présentatrices d'antigène grâce à l'utilisation de vecteurs ou en combinaison avec des agents stabilisateurs avec effet adjuvants<sup>241</sup>. Finalement, les vaccins oncolytiques utilisent des vecteurs viraux qui peuvent cibler directement les cellules cancéreuses et les éliminer, en plus de favoriser l'activation des réponses immunitaires anti-tumorales<sup>243</sup>.

Certains vaccins ont été approuvés par la FDA suite à la démonstration de leur efficacité pour le traitement des néoplasies, notamment un vaccin utilisant des DC générées *ex vivo* pour le traitement du cancer de la prostate asymptomatique résistant à la castration<sup>244</sup>, un vaccin utilisant des longs polypeptides pour le traitement de néoplasie intraépithéliale vulvaire<sup>245</sup> et l'ARN encapsulé dans des liposomes ou un vaccin oncolytique permettant l'expression de GM-CSF (facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages) par les cellules infectées pour le traitement du mélanome<sup>243,246,247</sup>. Néanmoins, jusqu'à présent, les diverses techniques de vaccination n'ont pas permis de générer les réponses immunitaires attendues, probablement du fait que les critères dictant la composition optimale du vaccin (adjuvant, composition, voie d'injection, sélection de cibles) dans le but de générer les meilleures réponses anti-tumorales sont encore mal compris<sup>169</sup>. De plus, contrairement aux vaccins utilisés dans des contextes infectieux, ceux visant l'élimination des cellules cancéreuses doivent briser la tolérance induite par l'environnement tumoral et permettre l'activation *in situ* des lymphocytes T<sup>169,242</sup>.

#### 1.4.3.1.3 Expansion *ex vivo* de lymphocytes T provenant de l'environnement tumoral

L'immunothérapie utilisant les lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL) repose sur l'expansion *ex vivo*, en présence d'IL-2, de lymphocytes T extraits depuis l'environnement tumoral du patient<sup>237,249</sup>. L'hypothèse supportant cette approche propose que, puisque présents dans l'environnement tumoral, ces TIL sont capables de reconnaître spécifiquement des antigènes présentés par les cellules cancéreuses mais que, due à l'environnement immunosuppresseur, ont été inactivés. Le processus de culture et d'expansion des lymphocytes T est non-spécifique et génère des cellules reconnaissant plusieurs antigènes simultanément plutôt qu'un antigène en particulier<sup>249</sup>. Néanmoins, l'utilisation de TIL représente présentement le meilleur traitement pour le mélanome métastatique, permettant d'atteindre jusqu'à 55% de réponses cliniques, parmi lesquelles 23% des patients bénéficient d'une régression complète des lésions tumorales<sup>250,251</sup>. De plus, l'expansion *ex vivo* de TIL a démontré une certaine efficacité pour le traitement du carcinome rénal<sup>252</sup> et du gliome<sup>253</sup>. Néanmoins, bien que les TIL puissent techniquement être extrait de n'importe quel type de tumeurs solides, seuls les mélanomes ont permis d'extraire des TIL de façon reproductible et en quantité suffisante pour permettre leur utilisation en pratique clinique courante<sup>249</sup>.

#### 1.4.3.1.4 Génération de lymphocytes T ayant un TCR transgénique

Les thérapies utilisant des lymphocytes T ayant un TCR transgénique sont très intéressantes puisqu'elles permettent de contourner les étapes de cultures et d'expansion requises pour la culture des TIL. D'un point de vue mécanistique, ces lymphocytes T modifiés fonctionnent de la même façon que les lymphocytes T portant un TCR endogène (**Figure 1.8**). Cependant, elles permettent l'utilisation de cellules provenant du patient ou d'un donneur compatible, en plus de cibler spécifiquement un antigène préalablement identifié sur les cellules cancéreuses. Néanmoins, cet avantage représente également le point limitant de cette technique, puisque l'élucidation moléculaire de la séquence du TCR permettant la reconnaissance d'un complexe pCMH doit être connue *a priori*<sup>169</sup>. De fait, cette technique peut être considérée comme partiellement personnalisée puisqu'un même lymphocyte T ayant un TCR transgénique pourrait être disponible pour plusieurs patients ayant le bon typage HLA et dont la tumeur exprime l'antigène préalablement identifié<sup>242</sup>.

Des régressions tumorales ont été observées dans 45 à 65% des patients atteints de mélanome et d'un sarcome synovial réfractaire suite à l'utilisation de lymphocytes T ayant un TCR transgénique<sup>254,255</sup>. Depuis, des tentatives d'amélioration des TCR utilisés pour l'immunothérapie du cancer ont mené à la génération de TCR de haute avidité pour leur cible, permettant de contourner les mécanismes de tolérance centrale et périphérique et de cibler des antigènes qui dérivent de séquences qui sont certes exprimées sur des tissus sains, mais qui sont fortement surexprimées dans les cellules cancéreuses<sup>256</sup>. Ainsi, bien que des réponses cliniques favorables ont été observées dans 80% des patients atteints de myélome multiple avancé traités avec ces lymphocytes T exprimant des TCR transgéniques de haute avidité<sup>257</sup>, ceux-ci peuvent également entraîner des effets secondaires majeurs<sup>242,258</sup>.

### **1.4.3.2 Les cibles antigéniques présentées à la surface des cellules cancéreuses**

Quel que soit le type de thérapie utilisé pour la stimulation spécifique des lymphocytes T, l'enjeu majeur demeure la connaissance *a priori* des cibles présentées par les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses expriment à leur surface un éventail de peptides associés aux molécules du CMH I et du CMH II. Puisqu'elles représentent des cellules du « soi-altéré » la majorité des antigènes présentés à la surface des cellules cancéreuses le seront en abondance et en séquence identique aux antigènes présentés sur les cellules normales. Néanmoins, il existe plusieurs types d'antigènes, d'origine conventionnelle ou cryptique, qui représentent des cibles potentielles pour les lymphocytes T et qui incluent les antigènes mineurs d'histocompatibilité (MiHA) (**Figure 1.9**) et les antigènes tumoraux (**Figure 1.10**). Bien que ces antigènes puissent être exprimés sur les deux types de molécules du CMH, la discussion sera limitée aux peptides pouvant induire les réponses CTL via la reconnaissance des complexes pCMH de classe I.

#### **1.4.3.2.1 Les antigènes mineurs d'histocompatibilité**

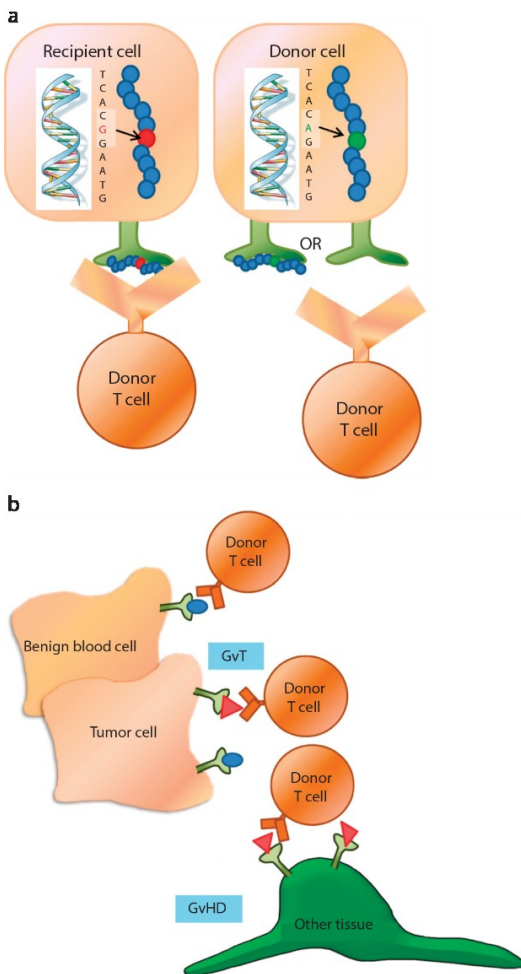
Les polymorphismes génétiques sont courants dans la population et peuvent affecter la composition en acide aminés de la protéine résultante, sans nécessairement en affecter la fonctionnalité. Ces mutations germinales peuvent également entraîner la génération de peptides, qui sont nommés MiHA, et qui sont la conséquence de n'importe quelle forme de modifications génétique germinale affectant leur présentation ou leur structure, tels que les polymorphismes

d'un seul nucléotide (SNP) et les insertions ou les délétions (InDels)<sup>259,260</sup>. De plus, les MiHA peuvent être générés à partir de séquences conventionnelles ou de séquences dites cryptiques<sup>45</sup> (Section 1.2.2.1, page 9). La majorité des MiHA identifiés à ce jour dérivent de SNP non-synonymes qui provoquent des modifications suffisamment importantes dans de la structure du peptide pour entraîner sa reconnaissance par les lymphocytes T d'un donneur sain lors d'un ACT (**Figure 1.9a**)<sup>260-262</sup>. D'ailleurs, les MiHA représentent les cibles préférentielles des lymphocytes T dans l'AHCT allogénique, tel que démontré par le fait que des patients ayant reçu un greffon provenant d'un donneur syngénique (jumeau identique), situation dans laquelle les antigènes tumoraux représentent les seules cibles potentielles des lymphocytes T du donneur, sont plus sujets à une rechute que les patients ayant reçu un greffon provenant d'un donneur HLA-compatible<sup>263</sup>. L'importance des MiHA dans l'AHCT est abordée plus en détails dans le chapitre 2. Néanmoins, cette section présentera les principales avancées dans le domaine des thérapies cellulaires visant les MiHA.

L'idée d'augmenter l'effet GVL tout en diminuant la GVHD en ciblant spécifiquement des MiHA est convoitée depuis plusieurs années<sup>259</sup>. Les thérapies utilisant les MiHA doivent cependant respecter certains critères. D'abord, il est nécessaire de trouver un donneur HLA-compatible qui n'exprime pas le même variant peptidique que le receveur<sup>261</sup>. De plus, il est préférable que le MiHA soit exprimé principalement sur le tissu cible pour éviter des effets toxiques<sup>264</sup> ou l'induction d'un phénotype d'épuisement dans les lymphocytes T<sup>265</sup>. Finalement, la connaissance préalable de la séquence des MiHA présentés par les cellules cancéreuses est nécessaire. Il aura fallu attendre jusqu'au milieu des années 1990 afin d'avoir une première caractérisation moléculaire de deux MiHA humain (HA-1 et HA-2), qui représentent aujourd'hui, les MiHA les mieux caractérisés chez l'homme<sup>261,266</sup>. Au cours des années suivantes, l'identification des MiHA a été limitée par les techniques disponibles et les efforts fournis pour identifier ne serait-ce qu'un seul MiHA. De fait, en 2014, les séquences de seulement 54 MiHA avaient été rapportées, parmi lesquels la grande majorité avait été identifiée dans les 5 années précédentes<sup>261</sup>. En 2016, des travaux combinant la spectrométrie de masse à la génomique ont permis d'identifier 119 MiHA humains, liant deux molécules du CMH I fréquentes dans la population, pour lesquels 39 sont considérés comme idéaux, c'est-à-dire que l'expression de leur transcrite source est principalement restreinte aux cellules



hématopoïétiques<sup>264</sup>. Néanmoins, jusqu'à présent, peu d'essais cliniques ont été effectués chez l'humain pour évaluer le potentiel thérapeutique des lymphocytes T spécifiques à un MiHA.



**Figure 1.9. Reconnaissance des MiHA par les lymphocytes T et leur rôles dans la GVHD et la GVT.** (A) Des polymorphismes génétiques menant à des modifications dans la séquence en acides aminés peuvent entraîner une présentation différentielle des MiHA par les molécules HLA sur les cellules d'un receveur (gauche) tandis que les cellules du donneur ne présentent pas l'antigène ou présentent un antigène d'une séquence différente (droite). (B) Selon le site et le niveau d'expression des MiHA, une GVT et/ou une GVHD peuvent être développés en réponse à une incompatibilité au niveau des MiHA présentés par le donneur et le receveur HLA-compatibles. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Bone Marrow Transplantation (Oostvogels, R., Lokhorst, H. M., Mutis, T.), copyright (2016)<sup>259</sup>

Des études chez la souris ont permis de démontrer que le traitement de leucémies et de tumeurs solides grâce à un ACT reconnaissant spécifiquement un MiHA est possible et ce, sans toxicité<sup>267,268</sup>. Néanmoins, jusqu'à présent, les essais cliniques visant à cibler spécifiquement les MiHA ont été restreints à un cadre de cancers hématologiques. En 2010, des lymphocytes T provenant d'un donneur ont été stimulés *ex vivo* spécifiquement contre des MiHA présents chez les receveurs, puis injectés chez des patients ayant subi une rechute après un AHCT. Ce faisant, 5 patients sur 7 ont bénéficié d'une rémission complète, quoi que temporaire, et 3 patients sur 7 ont souffert de toxicité pulmonaire<sup>269</sup>. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que la stimulation *ex vivo* des lymphocytes T doit permettre la génération de cellules effectrices qui

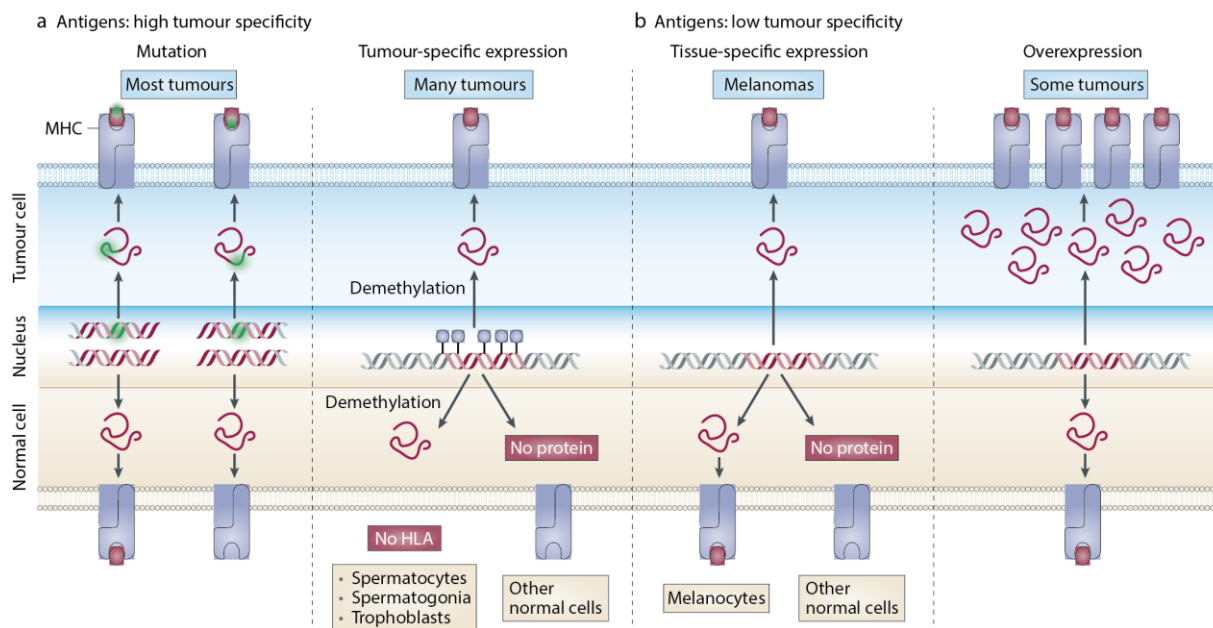


peuvent persister à long terme *in vivo*. Ils ont également réitéré le fait que la sélection de MiHA dont l'expression est restreinte au tissu cible est très importante<sup>261</sup>. Les avancées technologiques permettant l'identification à grande échelle des MiHA vont certainement favoriser l'ouverture de plusieurs essais cliniques visant à cibler spécifiquement les MiHA pour l'immunothérapie du cancer. De fait, des essais cliniques et précliniques sont en cours pour évaluer le potentiel thérapeutique de la vaccination avec des DC après un AHCT pour stimuler les réponses anti-MiHAs ou de l'utilisation de T-CAR reconnaissant le complexe formé de HA-1 et sa molécule HLA<sup>259,270</sup>. De plus, la faisabilité de générer des lymphocytes T MiHA-spécifiques dans un donneur sain, afin de fournir un greffon enrichi en lymphocytes T antigènes spécifiques, est présentement à l'étude<sup>261</sup>.

#### 1.4.3.2.2 Les antigènes tumoraux

Les antigènes tumoraux sont classifiés en plusieurs catégories, selon la restriction de leur expression dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. Les cellules cancéreuses peuvent exprimer des antigènes d'origine virale lorsque la néoplasie est induite par un virus et l'utilisation de ces antigènes comme cible thérapeutique prophylactique a été abordée dans la section 1.4.3.1.2 (page 40). Les cellules cancéreuses peuvent également présenter des antigènes associés aux tumeurs (TAA) qui proviennent de séquences non-mutées et exprimées dans les tissus sains. Cette catégorie d'antigènes regroupe des antigènes de faible spécificité tumorale qui sont générés depuis des protéines ou des transcrits surexprimés dans les cellules cancéreuses comparativement aux cellules saines (**Figure 1.10b-droite**) ou qui proviennent de transcrits exprimés exclusivement dans les cellules saines d'origine de la néoplasie (antigènes de différenciation cellulaire) (**Figure 1.10b-gauche**). De plus, les antigènes qui proviennent de séquences exclusivement exprimées dans les cellules cancéreuses sont connus sous le nom d'antigènes spécifiques aux tumeurs (TSA) et sont de haute spécificité tumorale. Les TSA peuvent être générés par des transcrits possédant une mutation somatique (**Figure 1.0a-gauche**) ou par des transcrits dont la séquence est normale, mais dont l'expression est réprimée dans les cellules saines. Ces antigènes provenant de transcrits exprimés de façon aberrante dans les cellules cancéreuses incluent les antigènes de cancer d'origine germinale (CTA) (**Figure 1.10a-droite**)<sup>271,272</sup>. Une base de données a été développée afin de répertorier les centaines d'antigènes

tumoraux identifiés depuis le début des années 1990, appartenant à ces différentes catégories (<https://www.cancerresearch.org/scientists/events-and-resources/peptide-database>)<sup>273</sup>.



**Figure 1.10. Différentes classes d'antigènes tumoraux peuvent être reconnus par les lymphocytes T et les mécanismes menant à leur génération.** (A) Les antigènes de haute spécificité tumorale incluent les antigènes qui dérivent de mutation somatique (gauche) ou de transcrits exprimés de façon aberrante dans les cellules cancéreuses (droite). (B) Les antigènes de faible spécificité tumorale incluent les antigènes de différenciation cellulaire et les antigènes qui dérivent de transcrits surexprimées dans le cancer. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T), copyright (2014)<sup>271</sup>

Les **antigènes provenant de transcrits surexprimés** représentent la catégorie d'antigènes la moins spécifique aux cellules cancéreuses. Néanmoins, divers essais cliniques et précliniques supportent le fait que des réponses antigéniques sont possibles contre ces antigènes. C'est le cas du facteur de transcription WT1 (protéine de la tumeur de Wilms), qui peut être exprimé dans certaines cellules du rein et dans les HSCs, mais qui est 10 à 1000x surexprimé dans les cellules leucémiques<sup>274</sup>. Il a été démontré que la vaccination contre cet antigène peut induire des réponses antigène-spécifique et des régressions tumorales dans certains individus, avec toxicité minimale<sup>275-277</sup>. Des lymphocytes T ayant un TCR transgénique reconnaissant spécifiquement WT1 et des anticorps reconnaissant le complexe WT1/HLA-A2 sont également en cours d'évaluation<sup>237,278</sup>. Le facteur de croissance HER2/Neu (récepteur pour les facteurs de

croissance épidermiques humains) est un autre antigène dérivant d'un gène surexprimé dans plusieurs cancers épithéliaux, tels que les cancers du sein et de l'ovaire. Malgré son expression dans les tissus sains, il a été démontré que la vaccination contre un antigène dérivant de cette protéine dans un contexte thérapeutique n'entraîne pas d'effets secondaires et permet une amélioration de la survie globale des patients<sup>279</sup>. Néanmoins, l'injection de T-CAR reconnaissant la protéine complète HER2/Neu a provoqué une toxicité pulmonaire fatale chez un patient atteint d'un cancer colorectal métastatique<sup>280</sup>, mettant en évidence que la manipulation de lymphocytes T reconnaissant des protéines dont l'expression est ubiquitaire n'est pas sans danger.

La majorité des **antigènes de différenciation cellulaire** identifiés à ce jour proviennent du mélanome (tel que MART-1 et gp100), du cancer de la prostate (tel que la PSA; antigène spécifique à la prostate et le PAP; phosphatase prostatique acide) et du cancer colorectal (tel que le CEA; antigène carcinoembryonique)<sup>271,281,282</sup>. Des analyses des répertoires antigène-spécifiques de TIL extraits de mélanomes ont mis en évidence que certains antigènes de différenciation permettent l'expansion des lymphocytes T *ex vivo*<sup>249</sup>, suggérant que la tolérance centrale contre ces antigènes est incomplète<sup>271</sup>. De fait, la vaccination de patients contre ces antigènes permet l'activation de lymphocytes T antigènes-spécifiques et ainsi qu'une amélioration des réponses cliniques et de la survie globale<sup>279,282,283</sup>. Ces antigènes ont également été ciblés par des thérapies utilisant des lymphocytes T ayant un TCR transgénique afin d'augmenter les réponses cliniques observées suite à la vaccination. Ainsi, des TCR de faible avidité dirigés contre MART-1 ont permis d'induire des régressions tumorales partielles chez des patients atteints d'un mélanome métastatique<sup>254</sup>. Néanmoins, l'utilisation de TCR de haute avidité reconnaissant MART-1 ou gp100 ont provoqué des effets secondaires sévères dans des patients atteints de mélanome, bien que des régressions tumorales aient été observées dans 30% et 19% des patients, respectivement<sup>284</sup>. De plus, le traitement de patients avec des lymphocytes T exprimant un TCR transgénique de haute avidité pour CEA n'a induit qu'une régression limitée des lésions tumorales, mais a également provoqué une destruction presque fatale de la muqueuse du côlon<sup>258</sup>, mettant une fois de plus en évidence que de cibler des antigènes également exprimés sur des cellules saines n'est pas sans danger.

Les **antigènes exprimés de façon aberrante** étudiés jusqu'à présent représentent essentiellement les CTA. Néanmoins, ils peuvent inclure n'importe quel antigène dérivant d'un gène dont l'expression est inhibée dans les cellules saines par un processus de méthylation, mais qui est réexprimé dans les cellules cancéreuses<sup>285-288</sup>. Ainsi, des séquences endogènes rétrovirales peuvent également générer des antigènes immunogènes, dont certains ont été identifiés, principalement dans des modèles murins<sup>289-291</sup>, mais également chez l'humain<sup>292,293</sup>. On estime d'ailleurs que le processus de déméthylation de l'ADN, très fréquent dans les cellules cancéreuses, serait responsable de l'expression de CTA dans 10 à 80% des cancers<sup>249</sup>. Les CTA sont encodés par des gènes qui sont exprimés dans plusieurs types de cancers, mais qui ne sont pas exprimés dans les tissus sains à l'exception des cellules germinales et trophoblastiques, cellules n'exprimant pas de CMH à leur surface cellulaire<sup>271</sup>. MAGE-A1 (antigène du mélanome de la famille A-1) a été le premier membre de la famille des CTA identifié en 1991<sup>294</sup>. Aujourd'hui, 276 gènes d'origine germinale ont été identifiés, pour lesquels les niveaux d'expression dans les cellules saines et les cellules cancéreuses sont variables. En effet, des analyses d'expression grâce aux données du consortium GTEx (Genotype-Tissue Expression) ont permis d'établir que seuls 60 gènes d'origine germinale sont réellement silencieux dans les cellules saines<sup>295</sup>.

Les CTA ont été utilisés dans plusieurs contextes thérapeutiques afin de générer des réponses anti-tumorales. La vaccination contre MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3 et NY-ESO-1 en utilisant des DC chargés, des peptides, des protéines ou des virus recombinants ont permis de générer des réponses immunitaires sans effets secondaires majeurs, bien que les réponses cliniques aient été minimales<sup>271,296-299</sup>. Des lymphocytes T possédant un TCR transgénique spécifique pour NY-ESO-1 ont permis d'induire des réponses anti-tumorales dans 45%, 65% et 80% des patients atteints de mélanome métastatique, de sarcome synovial ou de myélome multiple avancé, respectivement<sup>255,257</sup>. De plus, des lymphocytes T possédant un TCR transgénique de haute avidité pour MAGE-A3 ont été utilisés sur 6 patients dans deux essais cliniques. Bien que des réponses anti-tumorales aient été observées dans l'un des deux essais, 50% des patients sont décédés suite à une toxicité sévère au cerveau ou dans le myocarde. Dans tous les cas, des analyses post-mortem ont mis en évidence une réactivité croisée avec des antigènes présents dans le cerveau ou dans le cœur des patients<sup>300,301</sup>.

Les **TSA mutés** dérivent d'altérations génétiques dans les cellules cancéreuses qui ne sont pas présentes dans les cellules saines, et qui peuvent entraîner des changements dans le cadre de lecture du transcrit et dans la longueur de sa séquence codante. Ainsi, les transcrits portant des mutations peuvent générer des antigènes différents des séquences « normales » par un seul ou quelques acides aminés (variations d'un nucléotide; SNV ou petites InDels) ou dérivant de séquences totalement nouvelles (larges InDels et réarrangements chromosomiques complexes). Les antigènes conventionnels ou cryptiques dérivant de transcrits portant des mutations peuvent ainsi être exprimés, apprêtés, présentés et reconnus comme des antigènes du « soi-altéré » par des lymphocytes T qui n'ont pas été sujets aux mécanismes de tolérance centrale<sup>302</sup>. La majorité des TSA mutés identifiés dérivent de transcrits avec SNVs ou petites InDels. Néanmoins, des peptides provenant de translocations connues dans les leucémies, tel que BCR–ABL, ont été identifiés et sont capables d'induire des réponses immunitaires<sup>303-305</sup>. Suite à l'identification des premiers TSA mutés il y a plus de 30 ans, plusieurs études chez la souris et quelques-unes chez l'humain ont démontré que ces antigènes représentent des cibles intéressantes pour l'immunothérapie du cancer<sup>250,271</sup>. De fait, dans les modèles murins, la vaccination par des peptides longs ou courts, de même qu'avec des pentatopes d'ARN, permet l'induction de réponses immunitaires, en plus de ralentir la progression de la croissance de la tumeur et d'augmenter de la survie globale<sup>302,306-308</sup>. Chez l'humain, des DC chargées avec un mélange de 7 néoantigènes ont été utilisées pour vacciner des patients atteints de mélanome et, malgré qu'aucune réponse clinique n'ait été rapportée, des réponses immunitaires contre 9 des 21 antigènes identifiés ont été démontrées<sup>309</sup>. De plus, dans un cancer épithélial considéré comme ayant une faible charge mutationnelle, le cholangio-carcinome métastatique, une régression tumorale partielle a été observée suite à l'injection de lymphocytes T CD4 reconnaissant spécifiquement un TSA muté<sup>310</sup>.

De par leur grande diversité et leur nature patient-spécifique, les TSA ont jusqu'à présent été peu utilisés pour les ACT. De fait, l'identification à grande échelle de ce type d'antigène, tout comme pour les MiHA, n'a été possible qu'au milieu des années 2000 suite à l'avènement de nouvelles techniques de séquençage, qui seront discutées davantage dans le chapitre 4. Néanmoins, de plus en plus d'essais cliniques mettent à profit ces antigènes, qui sont perçus par plusieurs comme étant des cibles idéales pour l'immunothérapie du cancer<sup>241,271</sup>. En

contrepartie, des centaines d'essais cliniques ont jusqu'à présent ciblé principalement des TAA ou des TSA de la famille des CTA puisqu'ils peuvent être exprimés dans plusieurs types de cancers et donc, peuvent être partagés par plusieurs patients<sup>250</sup>. Néanmoins, il existe encore peu d'évidences de leur efficacité clinique pour le traitement des cancers. Ainsi, plusieurs études visent à combiner les différentes approches d'immunothérapie dans le but d'en augmenter les réponses cliniques observables. Dans certains cas, l'approche privilégiée est de combiner les approches d'immunothérapies entre elles, par exemple, en combinant des anticorps monoclonaux entre eux, avec des cytokines ou avec la vaccination, de même qu'avec des lymphocytes T ayant un CAR<sup>98,188,215,241</sup>. D'autres groupes favorisent l'induction d'une mort cellulaire immunogène des cellules cancéreuses, *via* des traitements de radiothérapie ou de chimiothérapie, laquelle pourrait permettre une réactivation du cycle immunité-cancer, puis d'utiliser des immunothérapies afin de stimuler d'avantage les réponses immunitaires<sup>169,210,279</sup>.

## 1.5 Résumé et objectif de la thèse

Dans un contexte où l'utilisation de lymphocytes T reconnaissant spécifiquement des antigènes exprimés sur les cellules cancéreuses représentent l'avenir des immunothérapies, la sélection des meilleurs antigènes à cibler est d'une importance capitale. Plusieurs groupes ont exploré le potentiel thérapeutique de trois grandes catégories d'antigènes présentés sur les cellules cancéreuses : les MiHA, les TAA et les TSA. Les TAA ont été fortement étudiés dans un contexte de tumeurs solides et moins dans des cancers hématologiques. Ces antigènes sont très intéressants d'un point de vue thérapeutique, puisque qu'ils sont partagés par plusieurs individus. Néanmoins, de nombreux travaux ont mis en évidence que, bien que les TAA peuvent induire des réponses immunitaires, leur potentiel thérapeutique est plutôt limité<sup>241,242,274-277,279,311-313</sup>. Du point de vue des lymphocytes T, les MiHA et les TSA représentent des cibles conceptuellement identiques : elles sont perçues comme du « non-soi ». Dans les deux cas, des altérations génétiques entraînent la génération de séquences peptidiques différentes de celles considérées comme le « soi ». Néanmoins, cet avantage immunogène représente également un obstacle majeur à leur identification à grande échelle<sup>42,261,264,279,314</sup>. De fait, peu d'essais cliniques utilisant des lymphocytes T reconnaissant spécifiquement des TSA ou des MiHA ont été effectués jusqu'à présent. Les MiHA ont été étudiés principalement dans le cadre du

traitement de cancers hématologiques par transfert adoptif de cellules hématopoïétiques et leur potentiel thérapeutique n'est plus à démontrer. Cependant, les thérapies ciblant les MiHA requièrent l'identification d'un donneur HLA-compatible portant l'allèle variant du MiHA du receveur afin de générer des réponses anti-tumorales. Les TSA représentent également des cibles thérapeutiques intéressantes de par leur expression spécifique aux cellules cancéreuses et du fait que des lymphocytes T autologues peuvent être utilisés, rendant l'identification d'un donneur compatible facultative. Jusqu'à présent, les TSA ont majoritairement été identifiés dans les tumeurs solides, particulièrement dans le mélanome. De fait, puisque leur abondance corrèle avec le niveau de mutation dans la cellule cancéreuse, il est généralement accepté que leur identification n'est possible que dans les cancers à haute charge mutationnelle (poumon, peau, côlon) plutôt que ceux à faible charge mutationnelle (leucémies)<sup>272,315-317</sup>.

Ainsi, jusqu'à présent, les thérapies utilisant des lymphocytes T ciblant les MiHA, les TAA et les TSA ont permis de mettre en évidence des avantages et des inconvénients pour chaque type d'antigènes, exposant du même coup une incompréhension des paramètres dictant l'immunogénicité de ces antigènes. Le choix des antigènes à cibler lors d'un ACT demeure grandement biaisé selon le type de cancer étudié : les MiHA pour les cancers hématologiques, les TAA et TSA pour les tumeurs solides. De fait, jamais ces différents types d'antigènes n'ont été comparés pour leur potentiel thérapeutique dans un seul modèle tumoral. Ainsi, une question cruciale demeure encore non-résolue : Quels sont les meilleurs antigènes à cibler pour l'immunothérapie du cancer? L'objectif de cette thèse était donc précisément de répondre à cette question, en plus de déterminer quels sont les critères dictant l'immunogénicité des antigènes permettant les régressions tumorales.

## 1.6 Références

1. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. *Janeway's immunobiology*, (Garland Science, New York, 2012).
2. Chaplin, D.D. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S3-23 (2010).
3. Huston, D.P. The biology of the immune system. *JAMA* **278**, 1804-1814 (1997).
4. Seita, J. & Weissman, I.L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, 640-653 (2010).
5. Collin, M. & Bigley, V. Monocyte, Macrophage, and Dendritic Cell Development: the Human Perspective. *Microbiol Spectr* **4**(2016).
6. Nimmo, R.A., May, G.E. & Enver, T. Primed and ready: understanding lineage commitment through single cell analysis. *Trends Cell Biol* **25**, 459-467 (2015).
7. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197 (2000).
8. Adolfsson, J., *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306 (2005).
9. Zhang, Y. & Liang, C. Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation. *Sci China Life Sci* **59**, 1210-1217 (2016).
10. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**, 317-337 (2009).
11. Broz, P. & Monack, D.M. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* **13**, 551-565 (2013).
12. Prussin, C. & Metcalfe, D.D. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **117**, S450-456 (2006).
13. Galli, S.J., Gordon, J.R. & Wershil, B.K. Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol* **3**, 865-872 (1991).
14. Minai-Fleminger, Y. & Levi-Schaffer, F. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res* **58**, 631-638 (2009).



15. Saha, N.R., Smith, J. & Amemiya, C.T. Evolution of adaptive immune recognition in jawless vertebrates. *Semin Immunol* **22**, 25-33 (2010).
16. Delves, P.J. & Roitt, I.M. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49 (2000).
17. Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517-1523 (1990).
18. Market, E. & Papavasiliou, F.N. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol* **1**, E16 (2003).
19. Bassing, C.H., Swat, W. & Alt, F.W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**, S45-55 (2002).
20. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F.W. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* **24**, 541-570 (2006).
21. Desiderio, S.V., *et al.* Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* **311**, 752-755 (1984).
22. Sun, J.C., Beilke, J.N. & Lanier, L.L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* **457**, 557-561 (2009).
23. Balato, A., Unutmaz, D. & Gaspari, A.A. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol* **129**, 1628-1642 (2009).
24. Blum, J.S., Wearsch, P.A. & Cresswell, P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* **31**, 443-473 (2013).
25. Rock, K.L., Reits, E. & Neefjes, J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol* **37**, 724-737 (2016).
26. Rodgers, J.R. & Cook, R.G. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol* **5**, 459-471 (2005).
27. Fehres, C.M., Unger, W.W., Garcia-Vallejo, J.J. & van Kooyk, Y. Understanding the biology of antigen cross-presentation for the design of vaccines against cancer. *Front Immunol* **5**, 149 (2014).

28. Wieczorek, M., *et al.* Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* **8**, 292 (2017).
29. Guo, H.C., *et al.* Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* **360**, 364-366 (1992).
30. Hassan, C., *et al.* Naturally processed non-canonical HLA-A\*02:01 presented peptides. *J Biol Chem* **290**, 2593-2603 (2015).
31. Glickman, M.H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428 (2002).
32. Kniepert, A. & Groettrup, M. The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem Sci* **39**, 17-24 (2014).
33. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* **9**, 833-844 (2009).
34. de Verteuil, D.A., *et al.* Immunoproteasomes shape the transcriptome and regulate the function of dendritic cells. *J Immunol* **193**, 1121-1132 (2014).
35. de Verteuil, D., Granados, D.P., Thibault, P. & Perreault, C. Origin and plasticity of MHC I-associated self peptides. *Autoimmun Rev* **11**, 627-635 (2012).
36. Kimura, H., Caturegli, P., Takahashi, M. & Suzuki, K. New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *J Immunol Res* **2015**, 541984 (2015).
37. Murata, S., *et al.* Regulation of CD8<sup>+</sup> T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349-1353 (2007).
38. Neefjes, J., Jongasma, M.L., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **11**, 823-836 (2011).
39. Princiotta, M.F., *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**, 343-354 (2003).
40. Yewdell, J.W., Reits, E. & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **3**, 952-961 (2003).

41. Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T. & Cresswell, P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* **5**, 103-114 (1996).
42. Yarchoan, M., Johnson, B.A., 3rd, Lutz, E.R., Laheru, D.A. & Jaffee, E.M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* **17**, 209-222 (2017).
43. Djebali, S., *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**, 101-108 (2012).
44. Laumont, C.M. & Perreault, C. Exploiting non-canonical translation to identify new targets for T cell-based cancer immunotherapy. *Cell Mol Life Sci* (2017).
45. Laumont, C.M., *et al.* Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nat Commun* **7**, 10238 (2016).
46. Starck, S.R. & Shastri, N. Nowhere to hide: unconventional translation yields cryptic peptides for immune surveillance. *Immunol Rev* **272**, 8-16 (2016).
47. Mohammed, F., *et al.* Phosphorylation-dependent interaction between antigenic peptides and MHC class I: a molecular basis for the presentation of transformed self. *Nat Immunol* **9**, 1236-1243 (2008).
48. Berkers, C.R., *et al.* Definition of Proteasomal Peptide Splicing Rules for High-Efficiency Spliced Peptide Presentation by MHC Class I Molecules. *J Immunol* **195**, 4085-4095 (2015).
49. Beck, M., *et al.* The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol* **7**, 549 (2011).
50. Nagaraj, N., *et al.* Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* **7**, 548 (2011).
51. Mester, G., Hoffmann, V. & Stevanovic, S. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1521-1532 (2011).
52. Milner, E., Barnea, E., Beer, I. & Admon, A. The turnover kinetics of major histocompatibility complex peptides of human cancer cells. *Mol Cell Proteomics* **5**, 357-365 (2006).
53. Weinzierl, A.O., *et al.* Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol Cell Proteomics* **6**, 102-113 (2007).

54. Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L.J. & Mann, M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics* **14**, 658-673 (2015).
55. Yewdell, J.W., Anton, L.C. & Bennink, J.R. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* **157**, 1823-1826 (1996).
56. Dolan, B.P., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. Translating DRiPs: progress in understanding viral and cellular sources of MHC class I peptide ligands. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1481-1489 (2011).
57. Farfan-Arribas, D.J., Stern, L.J. & Rock, K.L. Using intein catalysis to probe the origin of major histocompatibility complex class I-presented peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 16998-17003 (2012).
58. Rock, K.L., Farfan-Arribas, D.J., Colbert, J.D. & Goldberg, A.L. Re-examining class-I presentation and the DRiP hypothesis. *Trends Immunol* **35**, 144-152 (2014).
59. Anton, L.C. & Yewdell, J.W. Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. *J Leukoc Biol* **95**, 551-562 (2014).
60. Cardinaud, S., Starck, S.R., Chandra, P. & Shastri, N. The synthesis of truncated polypeptides for immune surveillance and viral evasion. *PLoS One* **5**, e8692 (2010).
61. Steimle, V., Siegrist, C.A., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B. & Mach, B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* **265**, 106-109 (1994).
62. Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A. & Janeway, C.A., Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622-627 (1991).
63. Meydan, C., Otu, H.H. & Sezerman, O.U. Prediction of peptides binding to MHC class I and II alleles by temporal motif mining. *BMC Bioinformatics* **14 Suppl 2**, S13 (2013).
64. Roche, P.A. & Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* **15**, 203-216 (2015).
65. Cresswell, P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* **84**, 505-507 (1996).
66. Hofmann, M.W., *et al.* The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem* **274**, 36153-36158 (1999).

67. Aw, D., Silva, A.B. & Palmer, D.B. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* **120**, 435-446 (2007).
68. Elmore, S.A. Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicol Pathol* **34**, 656-665 (2006).
69. Zdrojewicz, Z., Pachura, E. & Pachura, P. The Thymus: A Forgotten, But Very Important Organ. *Adv Clin Exp Med* **25**, 369-375 (2016).
70. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* **14**, 377-391 (2014).
71. Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T. & Zlotnik, A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* **150**, 4244-4252 (1993).
72. Bowlus, C.L., Ahn, J., Chu, T. & Gruen, J.R. Cloning of a novel MHC-encoded serine peptidase highly expressed by cortical epithelial cells of the thymus. *Cell Immunol* **196**, 80-86 (1999).
73. Nitta, T., *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* **32**, 29-40 (2010).
74. Gommeaux, J., *et al.* Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes. *Eur J Immunol* **39**, 956-964 (2009).
75. Honey, K., Nakagawa, T., Peters, C. & Rudensky, A. Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med* **195**, 1349-1358 (2002).
76. Nakagawa, T., *et al.* Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-453 (1998).
77. Germain, R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-322 (2002).
78. McCaughy, T.M., Baldwin, T.A., Wilken, M.S. & Hogquist, K.A. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med* **205**, 2575-2584 (2008).
79. Atibalentja, D.F., Murphy, K.M. & Unanue, E.R. Functional redundancy between thymic CD8 $\alpha$ + and Sirp $\alpha$ + conventional dendritic cells in presentation of blood-derived lysozyme by MHC class II proteins. *J Immunol* **186**, 1421-1431 (2011).

80. Hubert, F.X., *et al.* Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* **118**, 2462-2472 (2011).
81. Ardouin, L., *et al.* Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. *Immunity* **45**, 305-318 (2016).
82. Derbinski, J., Pinto, S., Rosch, S., Hexel, K. & Kyewski, B. Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 657-662 (2008).
83. Le Borgne, M., *et al.* The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla. *Nat Immunol* **10**, 823-830 (2009).
84. Ueda, Y., *et al.* Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus. *Nat Commun* **3**, 1098 (2012).
85. Ehrlich, L.I., Oh, D.Y., Weissman, I.L. & Lewis, R.S. Differential contribution of chemotaxis and substrate restriction to segregation of immature and mature thymocytes. *Immunity* **31**, 986-998 (2009).
86. Xing, Y. & Hogquist, K.A. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(2012).
87. Dorfman, J.R. & Germain, R.N. MHC-dependent survival of naive T cells? A complicated answer to a simple question. *Microbes Infect* **4**, 547-554 (2002).
88. Takada, K. & Jameson, S.C. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* **9**, 823-832 (2009).
89. Takada, K. & Jameson, S.C. Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *J Exp Med* **206**, 2253-2269 (2009).
90. Rathmell, J.C., Farkash, E.A., Gao, W. & Thompson, C.B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* **167**, 6869-6876 (2001).
91. Rochman, Y. & Leonard, W.J. The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol* **181**, 7699-7705 (2008).
92. Vivien, L., Benoist, C. & Mathis, D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive *in vivo*. *Int Immunol* **13**, 763-768 (2001).

93. Richards, D.M., Kyewski, B. & Feuerer, M. Re-examining the Nature and Function of Self-Reactive T cells. *Trends Immunol* **37**, 114-125 (2016).
94. Wucherpfennig, K.W., Call, M.J., Deng, L. & Mariuzza, R. Structural alterations in peptide-MHC recognition by self-reactive T cell receptors. *Curr Opin Immunol* **21**, 590-595 (2009).
95. Bluestone, J.A., Bour-Jordan, H., Cheng, M. & Anderson, M. T cells in the control of organ-specific autoimmunity. *J Clin Invest* **125**, 2250-2260 (2015).
96. Liu, G.Y., *et al.* Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* **3**, 407-415 (1995).
97. Mueller, D.L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* **11**, 21-27 (2010).
98. Schietinger, A. & Greenberg, P.D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol* **35**, 51-60 (2014).
99. Karlsen, A.E. & Dyrberg, T. Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. *Semin Immunol* **10**, 25-34 (1998).
100. Wooldridge, L., *et al.* A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J Biol Chem* **287**, 1168-1177 (2012).
101. Shechter, R., London, A. & Schwartz, M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol* **13**, 206-218 (2013).
102. Singer, A., Adoro, S. & Park, J.H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* **8**, 788-801 (2008).
103. Hugues, S., *et al.* Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* **5**, 1235-1242 (2004).
104. Katzman, S.D., *et al.* Duration of antigen receptor signaling determines T-cell tolerance or activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18085-18090 (2010).
105. Hernandez, J., Aung, S., Redmond, W.L. & Sherman, L.A. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* **194**, 707-717 (2001).
106. Redmond, W.L., Marincek, B.C. & Sherman, L.A. Distinct requirements for deletion versus anergy during CD8 T cell peripheral tolerance *in vivo*. *J Immunol* **174**, 2046-2053 (2005).

107. Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F. & Heath, W.R. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* **186**, 239-245 (1997).
108. Kuklina, E.M. Molecular mechanisms of T-cell anergy. *Biochemistry (Mosc)* **78**, 144-156 (2013).
109. Maeda, Y., *et al.* Detection of self-reactive CD8(+) T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. *Science* **346**, 1536-1540 (2014).
110. Gardner, J.M., *et al.* Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* **321**, 843-847 (2008).
111. Wing, K. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* **11**, 7-13 (2010).
112. Hsieh, C.S., *et al.* Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* **21**, 267-277 (2004).
113. Jordan, M.S., *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* **2**, 301-306 (2001).
114. Bluestone, J.A. & Abbas, A.K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* **3**, 253-257 (2003).
115. Legoux, F.P., *et al.* CD4+ T Cell Tolerance to Tissue-Restricted Self Antigens Is Mediated by Antigen-Specific Regulatory T Cells Rather Than Deletion. *Immunity* **43**, 896-908 (2015).
116. Richards, D.M., *et al.* The Contained Self-Reactive Peripheral T Cell Repertoire: Size, Diversity, and Cellular Composition. *J Immunol* **195**, 2067-2079 (2015).
117. Tadokoro, C.E., *et al.* Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med* **203**, 505-511 (2006).
118. Tang, Q. & Bluestone, J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* **9**, 239-244 (2008).
119. Laidlaw, B.J., Craft, J.E. & Kaech, S.M. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol* **16**, 102-111 (2016).
120. Jenkins, M.K. & Moon, J.J. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol* **188**, 4135-4140 (2012).



121. den Haan, J.M., Arens, R. & van Zelm, M.C. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett* **162**, 103-112 (2014).
122. Williams, M.A. & Bevan, M.J. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* **25**, 171-192 (2007).
123. Curtsinger, J.M. & Mescher, M.F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* **22**, 333-340 (2010).
124. Zhang, N. & Bevan, M.J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* **35**, 161-168 (2011).
125. Mescher, M.F., *et al.* Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* **211**, 81-92 (2006).
126. Delves, P.J. & Roitt, I.M. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108-117 (2000).
127. Moon, J.J., *et al.* Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* **27**, 203-213 (2007).
128. Obar, J.J., Khanna, K.M. & Lefrancois, L. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* **28**, 859-869 (2008).
129. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S. T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**, 591-619 (2009).
130. Williams, M.A., Tyznik, A.J. & Bevan, M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* **441**, 890-893 (2006).
131. Bachmann, M.F., Wolint, P., Walton, S., Schwarz, K. & Oxenius, A. Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol* **37**, 1502-1512 (2007).
132. Kalia, V., *et al.* Prolonged interleukin-2R $\alpha$  expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation *in vivo*. *Immunity* **32**, 91-103 (2010).
133. Pipkin, M.E., *et al.* Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* **32**, 79-90 (2010).

134. Rudd, C.E., Taylor, A. & Schneider, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* **229**, 12-26 (2009).
135. O'Donnell, J.S., Smyth, M.J. & Teng, M.W.L. PD1 functions by inhibiting CD28-mediated co-stimulation. *Clin Transl Immunology* **6**, e138 (2017).
136. Zhang, S., Zhang, H. & Zhao, J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Biophys Res Commun* **384**, 405-408 (2009).
137. Joshi, N.S., *et al.* Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27**, 281-295 (2007).
138. Takemoto, N., Intlekofer, A.M., Northrup, J.T., Wherry, E.J. & Reiner, S.L. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* **177**, 7515-7519 (2006).
139. Almeida, J.R., *et al.* Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* **113**, 6351-6360 (2009).
140. Podack, E.R. Functional significance of two cytolytic pathways of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* **57**, 548-552 (1995).
141. Fesnak, A.D., June, C.H. & Levine, B.L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **16**, 566-581 (2016).
142. Vigano, S., *et al.* Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? *Clin Dev Immunol* **2012**, 153863 (2012).
143. Kotturi, M.F., *et al.* Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the degree of epitope diversity shape CD8+ T cell immunodominance. *J Immunol* **181**, 2124-2133 (2008).
144. Kedzierska, K., La Gruta, N.L., Davenport, M.P., Turner, S.J. & Doherty, P.C. Contribution of T cell receptor affinity to overall avidity for virus-specific CD8+ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11432-11437 (2005).
145. Swain, S.L., McKinstry, K.K. & Strutt, T.M. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* **12**, 136-148 (2012).
146. Stockinger, B. & Omenetti, S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol* **17**, 535-544 (2017).

147. Yang, Y., Ochando, J.C., Bromberg, J.S. & Ding, Y. Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN $\gamma$ /Stat1 signals. *Blood* **110**, 2494-2500 (2007).
148. Jain, A. & Pasare, C. Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *J Immunol* **198**, 3791-3800 (2017).
149. Sacks, J.A. & Bevan, M.J. TRAIL deficiency does not rescue impaired CD8<sup>+</sup> T cell memory generated in the absence of CD4<sup>+</sup> T cell help. *J Immunol* **180**, 4570-4576 (2008).
150. Janssen, E.M., *et al.* CD4<sup>+</sup> T-cell help controls CD8<sup>+</sup> T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**, 88-93 (2005).
151. Hamilton, S.E., Tvinnereim, A.R. & Harty, J.T. Listeria monocytogenes infection overcomes the requirement for CD40 ligand in exogenous antigen presentation to CD8(+) T cells. *J Immunol* **167**, 5603-5609 (2001).
152. Wiesel, M. & Oxenius, A. From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help. *Eur J Immunol* **42**, 1080-1088 (2012).
153. Shedlock, D.J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-339 (2003).
154. von Herrath, M.G., Yokoyama, M., Dockter, J., Oldstone, M.B. & Whitton, J.L. CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* **70**, 1072-1079 (1996).
155. Wiesel, M., Kratky, W. & Oxenius, A. Type I IFN substitutes for T cell help during viral infections. *J Immunol* **186**, 754-763 (2011).
156. Sikora, E. Activation-induced and damage-induced cell death in aging human T cells. *Mech Ageing Dev* **151**, 85-92 (2015).
157. Kaech, S.M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **12**, 749-761 (2012).
158. Zediak, V.P., Wherry, E.J. & Berger, S.L. The contribution of epigenetic memory to immunologic memory. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 154-159 (2011).
159. Denton, A.E., Russ, B.E., Doherty, P.C., Rao, S. & Turner, S.J. Differentiation-dependent functional and epigenetic landscapes for cytokine genes in virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15306-15311 (2011).

160. Farber, D.L., Yudanin, N.A. & Restifo, N.P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**, 24-35 (2014).
161. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712 (1999).
162. Hamann, D., *et al.* Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* **186**, 1407-1418 (1997).
163. Caserta, S., Borger, J.G. & Zamoyska, R. Central and effector memory CD4 and CD8 T-cell responses to tumor-associated antigens. *Crit Rev Immunol* **32**, 97-126 (2012).
164. Gattinoni, L., *et al.* A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* **17**, 1290-1297 (2011).
165. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L. & Lefrancois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**, 2413-2417 (2001).
166. Schenkel, J.M., *et al.* T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* **346**, 98-101 (2014).
167. Ariotti, S., *et al.* T cell memory. Skin-resident memory CD8(+) T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* **346**, 101-105 (2014).
168. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
169. Chen, D.S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1-10 (2013).
170. Egeblad, M., Nakasone, E.S. & Werb, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* **18**, 884-901 (2010).
171. Pages, F., *et al.* Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**, 1093-1102 (2010).
172. Nelson, B.H. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* **222**, 101-116 (2008).
173. Galon, J., *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960-1964 (2006).

174. Galon, J., *et al.* Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* **232**, 199-209 (2014).
175. Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**, 298-306 (2012).
176. Ribas, A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discov* **5**, 915-919 (2015).
177. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998 (2002).
178. Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565-1570 (2011).
179. Matsushita, H., *et al.* Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* **482**, 400-404 (2012).
180. Cali, B., Molon, B. & Viola, A. Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. *Open Biol* **7**(2017).
181. Farrar, J.D., *et al.* Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8<sup>+</sup> T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. *J Immunol* **162**, 2842-2849 (1999).
182. Atkins, D., *et al.* MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* **109**, 265-273 (2004).
183. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252-264 (2012).
184. DeNardo, D.G., Andreu, P. & Coussens, L.M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* **29**, 309-316 (2010).
185. Grivnenikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899 (2010).
186. Qian, B.Z. & Pollard, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51 (2010).
187. Mantovani, A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med* **10**, 369-373 (2010).
188. Wherry, E.J. T cell exhaustion. *Nat Immunol* **12**, 492-499 (2011).

189. Speiser, D.E. A molecular profile of T-cell exhaustion in cancer. *Oncoimmunology* **1**, 369-371 (2012).
190. Zuniga, E.I. & Harker, J.A. T-cell exhaustion due to persistent antigen: quantity not quality? *Eur J Immunol* **42**, 2285-2289 (2012).
191. Kao, C., *et al.* Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol* **12**, 663-671 (2011).
192. Ruffell, B. & Coussens, L.M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* **27**, 462-472 (2015).
193. Ostrand-Rosenberg, S. & Sinha, P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* **182**, 4499-4506 (2009).
194. Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R. & Johansson, C.C. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* **107**, 57-117 (2010).
195. Bunt, S.K., *et al.* Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* **67**, 10019-10026 (2007).
196. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* **5**, 263-274 (2005).
197. Mellor, A.L. & Munn, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* **4**, 762-774 (2004).
198. Kaufmann, D.E., *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* **8**, 1246-1254 (2007).
199. Nakamoto, N., *et al.* Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* **5**, e1000313 (2009).
200. Blattman, J.N., *et al.* Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses *in vivo*. *Nat Med* **9**, 540-547 (2003).
201. Rehr, M., *et al.* Emergence of polyfunctional CD8<sup>+</sup> T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *J Virol* **82**, 3391-3404 (2008).

202. Appelbaum, F.R. Hematopoietic cell transplantation as a form of immunotherapy. *Int J Hematol* **75**, 222-227 (2002).
203. Barrett, A.J. Mechanisms of the graft-versus-leukemia reaction. *Stem Cells* **15**, 248-258 (1997).
204. Chakraverty, R., *et al.* Host MHC class II+ antigen-presenting cells and CD4 cells are required for CD8-mediated graft-versus-leukemia responses following delayed donor leukocyte infusions. *Blood* **108**, 2106-2113 (2006).
205. Nikiforow, S. & Alyea, E.P. Maximizing GVL in allogeneic transplantation: role of donor lymphocyte infusions. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2014**, 570-575 (2014).
206. Gratwohl, A., *et al.* Alloreactivity: the Janus-face of hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* **31**, 1752-1759 (2017).
207. Bonnet, D., Warren, E.H., Greenberg, P.D., Dick, J.E. & Riddell, S.R. CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8639-8644 (1999).
208. Beavis, P.A., *et al.* Reprogramming the tumor microenvironment to enhance adoptive cellular therapy. *Semin Immunol* **28**, 64-72 (2016).
209. Medina-Echeverz, J., *et al.* Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *J Immunol* **186**, 807-815 (2011).
210. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* **31**, 51-72 (2013).
211. Zhou, Q., *et al.* Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia. *Blood* **114**, 3793-3802 (2009).
212. Formenti, S.C. & Demaria, S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* **105**, 256-265 (2013).
213. Ott, P.A., Hodi, F.S., Kaufman, H.L., Wigginton, J.M. & Wolchok, J.D. Combination immunotherapy: a road map. *J Immunother Cancer* **5**, 16 (2017).
214. Makkouk, A. & Weiner, G.J. Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer Res* **75**, 5-10 (2015).

215. Khalil, D.N., Smith, E.L., Brentjens, R.J. & Wolchok, J.D. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* **13**, 273-290 (2016).
216. Schadendorf, D., *et al.* Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* **33**, 1889-1894 (2015).
217. Postow, M.A., *et al.* Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* **372**, 2006-2017 (2015).
218. Weber, J.S., Kahler, K.C. & Hauschild, A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* **30**, 2691-2697 (2012).
219. Hodi, F.S., *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711-723 (2010).
220. Robert, C., *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* **372**, 320-330 (2015).
221. Rizvi, N.A., *et al.* Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* **16**, 257-265 (2015).
222. Zhang, T., *et al.* The efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 antibodies for treatment of advanced or refractory cancers: a meta-analysis. *Oncotarget* **7**, 73068-73079 (2016).
223. Yang, J.C., *et al.* Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* **30**, 825-830 (2007).
224. Royal, R.E., *et al.* Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother* **33**, 828-833 (2010).
225. Ansell, S.M., *et al.* PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **372**, 311-319 (2015).
226. Powles, T., *et al.* MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* **515**, 558-562 (2014).
227. Sakuishi, K., *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* **207**, 2187-2194 (2010).



228. Schaer, D.A., Cohen, A.D. & Wolchok, J.D. Anti-GITR antibodies--potential clinical applications for tumor immunotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 1378-1386 (2010).
229. Beatty, G.L., *et al.* CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* **331**, 1612-1616 (2011).
230. Molckovsky, A. & Siu, L.L. First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting. *J Hematol Oncol* **1**, 20 (2008).
231. Geldres, C., Savoldo, B. & Dotti, G. Chimeric antigen receptor-redirected T cells return to the bench. *Semin Immunol* **28**, 3-9 (2016).
232. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480-489 (2011).
233. Maude, S.L., *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* **371**, 1507-1517 (2014).
234. Davila, M.L., *et al.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* **6**, 224ra225 (2014).
235. Kochenderfer, J.N., *et al.* Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol* **33**, 540-549 (2015).
236. Garfall, A.L., *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **373**, 1040-1047 (2015).
237. Baruch, E.N., Berg, A.L., Besser, M.J., Schachter, J. & Markel, G. Adoptive T cell therapy: An overview of obstacles and opportunities. *Cancer* **123**, 2154-2162 (2017).
238. Barrett, D.M., Grupp, S.A. & June, C.H. Chimeric Antigen Receptor- and TCR-Modified T Cells Enter Main Street and Wall Street. *J Immunol* **195**, 755-761 (2015).
239. Berger, M., Kreutz, F.T., Horst, J.L., Baldi, A.C. & Koff, W.J. Phase I study with an autologous tumor cell vaccine for locally advanced or metastatic prostate cancer. *J Pharm Pharm Sci* **10**, 144-152 (2007).
240. Mach, N., *et al.* Differences in dendritic cells stimulated *in vivo* by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res* **60**, 3239-3246 (2000).

241. Guo, C., *et al.* Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res* **119**, 421-475 (2013).
242. Topalian, S.L., Weiner, G.J. & Pardoll, D.M. Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol* **29**, 4828-4836 (2011).
243. Hamid, O., Hoffner, B., Gasal, E., Hong, J. & Carvajal, R.D. Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer. *Cancer Immunol Immunother* (2017).
244. Cheever, M.A. & Higano, C.S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* **17**, 3520-3526 (2011).
245. Kenter, G.G., *et al.* Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* **361**, 1838-1847 (2009).
246. Kranz, L.M., *et al.* Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **534**, 396-401 (2016).
247. Kaufman, H.L., *et al.* Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 718-730 (2010).
248. Gulley, J.L., Madan, R.A. & Schlom, J. Impact of tumour volume on the potential efficacy of therapeutic vaccines. *Curr Oncol* **18**, e150-157 (2011).
249. Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* **348**, 62-68 (2015).
250. Tran, E., Robbins, P.F. & Rosenberg, S.A. 'Final common pathway' of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations. *Nat Immunol* **18**, 255-262 (2017).
251. Rosenberg, S.A., *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* **17**, 4550-4557 (2011).
252. Figlin, R.A., *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8(+) selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J Urol* **158**, 740-745 (1997).
253. Quattrocchi, K.B., *et al.* Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* **45**, 141-157 (1999).

254. Morgan, R.A., *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* **314**, 126-129 (2006).
255. Robbins, P.F., *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* **29**, 917-924 (2011).
256. Schmitt, T.M., *et al.* Enhanced-affinity murine T-cell receptors for tumor/self-antigens can be safe in gene therapy despite surpassing the threshold for thymic selection. *Blood* **122**, 348-356 (2013).
257. Rapoport, A.P., *et al.* NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* **21**, 914-921 (2015).
258. Parkhurst, M.R., *et al.* T Cells Targeting Carcinoembryonic Antigen Can Mediate Regression of Metastatic Colorectal Cancer but Induce Severe Transient Colitis. *Mol Ther* **19**, 620-626 (2011).
259. Oostvogels, R., Lokhorst, H.M. & Mutis, T. Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives. *Bone Marrow Transplant* **51**, 163-171 (2016).
260. Roopenian, D., Choi, E.Y. & Brown, A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev* **190**, 86-94 (2002).
261. Spierings, E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens* **84**, 374-360 (2014).
262. Granados, D.P., Laumont, C.M., Thibault, P. & Perreault, C. The nature of self for T cells-a systems-level perspective. *Curr Opin Immunol* **34**, 1-8 (2015).
263. Feng, X., Hui, K.M., Younes, H.M. & Brickner, A.G. Targeting minor histocompatibility antigens in graft versus tumor or graft versus leukemia responses. *Trends Immunol* **29**, 624-632 (2008).
264. Granados, D.P., *et al.* Proteogenomic-based discovery of minor histocompatibility antigens with suitable features for immunotherapy of hematologic cancers. *Leukemia* **30**, 1344-1354 (2016).
265. Asakura, S., *et al.* Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice. *J Clin Invest* **120**, 2370-2378 (2010).

266. den Haan, J.M., *et al.* Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* **268**, 1476-1480 (1995).
267. Fontaine, P., *et al.* Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med* **7**, 789-794 (2001).
268. Meunier, M.C., *et al.* T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med* **11**, 1222-1229 (2005).
269. Warren, E.H., *et al.* Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* **115**, 3869-3878 (2010).
270. Inaguma, Y., *et al.* Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. *Gene Ther* **21**, 575-584 (2014).
271. Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **14**, 135-146 (2014).
272. Schreiber, T.N.S.a.R.D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 7 (2015).
273. Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immun* **13**, 15 (2013).
274. Cilloni, D., *et al.* Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* **16**, 2115-2121 (2002).
275. Chapuis, A.G., *et al.* Transferred WT1-reactive CD8<sup>+</sup> T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med* **5**, 174ra127 (2013).
276. Oka, Y., *et al.* Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13885-13890 (2004).
277. Keilholz, U., *et al.* A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* **113**, 6541-6548 (2009).

278. Dao, T., *et al.* Targeting the intracellular WT1 oncogene product with a therapeutic human antibody. *Sci Transl Med* **5**, 176ra133 (2013).
279. Melero, I., *et al.* Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 509-524 (2014).
280. Morgan, R.A., *et al.* Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* **18**, 843-851 (2010).
281. Brichard, V., *et al.* The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* **178**, 489-495 (1993).
282. Morse, M.A., *et al.* Novel adenoviral vector induces T-cell responses despite anti-adenoviral neutralizing antibodies in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **62**, 1293-1301 (2013).
283. Schwartztruber, D.J., *et al.* gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* **364**, 2119-2127 (2011).
284. Johnson, L.A., *et al.* Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* **114**, 535-546 (2009).
285. Weber, J., *et al.* Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **54**, 1766-1771 (1994).
286. Anwar, S.L., Wulaningsih, W. & Lehmann, U. Transposable Elements in Human Cancer: Causes and Consequences of Deregulation. *Int J Mol Sci* **18**(2017).
287. Szpakowski, S., *et al.* Loss of epigenetic silencing in tumors preferentially affects primate-specific retroelements. *Gene* **448**, 151-167 (2009).
288. Kassiotis, G. & Stoye, J.P. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat Rev Immunol* **16**, 207-219 (2016).
289. Kershaw, M.H., *et al.* Immunization against endogenous retroviral tumor-associated antigens. *Cancer Res* **61**, 7920-7924 (2001).
290. Malarkannan, S., Serwold, T., Nguyen, V., Sherman, L.A. & Shastri, N. The mouse mammary tumor virus env gene is the source of a CD8+ T-cell-stimulating peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule in a murine thymoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13991-13996 (1996).

291. Huang, A.Y., *et al.* The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9730-9735 (1996).
292. Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., Boon, T. & Coulie, P.G. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* **62**, 5510-5516 (2002).
293. Takahashi, Y., *et al.* Regression of human kidney cancer following allogeneic stem cell transplantation is associated with recognition of an HERV-E antigen by T cells. *J Clin Invest* **118**, 1099-1109 (2008).
294. van der Bruggen, P., *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-1647 (1991).
295. Rooney, M.S., Shukla, S.A., Wu, C.J., Getz, G. & Hacoheh, N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* **160**, 48-61 (2015).
296. Oshita, C., *et al.* Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: phase II clinical trial. *Oncol Rep* **28**, 1131-1138 (2012).
297. Robbins, P.F., *et al.* A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* **21**, 1019-1027 (2015).
298. Odunsi, K., *et al.* Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5797-5802 (2012).
299. Kerkar, S.P., *et al.* MAGE-A is More Highly Expressed Than NY-ESO-1 in a Systematic Immunohistochemical Analysis of 3668 Cases. *J Immunother* **39**, 181-187 (2016).
300. Morgan, R.A., *et al.* Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* **36**, 133-151 (2013).
301. Linette, G.P., *et al.* Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* **122**, 863-871 (2013).
302. Lu, Y.C. & Robbins, P.F. Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Semin Immunol* **28**, 22-27 (2016).

303. Bosch, G.J., Joosten, A.M., Kessler, J.H., Melief, C.J. & Leeksa, O.C. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary *in vitro* immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* **88**, 3522-3527 (1996).
304. Yotnda, P., *et al.* Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **101**, 2290-2296 (1998).
305. Makita, M., *et al.* Leukemia-associated fusion proteins, dek-can and bcr-abl, represent immunogenic HLA-DR-restricted epitopes recognized by fusion peptide-specific CD4+ T lymphocytes. *Leukemia* **16**, 2400-2407 (2002).
306. Castle, J.C., *et al.* Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* **72**, 1081-1091 (2012).
307. Yadav, M., *et al.* Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* **515**, 572-576 (2014).
308. Kreiter, S., *et al.* Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* **520**, 692-696 (2015).
309. Carreno, B.M., *et al.* Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science* **348**, 803-808 (2015).
310. Tran, E., *et al.* Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* **344**, 641-645 (2014).
311. Mouldrem, J.J., *et al.* Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* **6**, 1018-1023 (2000).
312. Rezvani, K., *et al.* Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **110**, 1924-1932 (2007).
313. Rossmann, E., *et al.* Mucin 1-specific active cancer immunotherapy with tecemotide (L-BLP25) in patients with multiple myeloma: an exploratory study. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 3394-3408 (2014).
314. Bleakley, M. & Riddell, S.R. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol Cell Biol* **89**, 396-407 (2011).

315. Shukla, S.A., Howitt, B.E., Wu, C.J. & Konstantinopoulos, P.A. Predicted neoantigen load in non-hypermutated endometrial cancers: Correlation with outcome and tumor-specific genomic alterations. *Gynecol Oncol Rep* **19**, 42-45 (2017).
316. Van Allen, E.M., *et al.* Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* **350**, 207-211 (2015).
317. Blank, C.U., Haanen, J.B., Ribas, A. & Schumacher, T.N. CANCER IMMUNOLOGY. The "cancer immunogram". *Science* **352**, 658-660 (2016).



## **Chapitre 2**

**Next-generation leukemia immunotherapy**

**Référence de publication:**

Blood, 118(11):2951-9, 2011

## 2. Next-generation leukemia immunotherapy

**Running title:** Leukemia immunotherapy

Krystal Vincent<sup>1,2</sup>, Denis-Claude Roy<sup>2,3</sup>, Claude Perreault<sup>1,2,3</sup>

Institute for Research in Immunology and Cancer<sup>1</sup> and Department of Medicine<sup>2</sup>, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada. Division of Hematology, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montreal<sup>3</sup>.

Address correspondence to: Claude Perreault ([claudio.perreault@umontreal.ca](mailto:claudio.perreault@umontreal.ca)), Institute for Research in Immunology and Cancer

## **2.1 Mise en contexte de l'article**

Cet article de revue publié en 2011 vient compléter l'introduction portant sur les différents types d'immunothérapies utilisant des lymphocytes T, stimulés ou non contre un antigène présenté à la surface des cellules cancéreuses. Mettant en lumière l'historique d'utilisation du AHCT ainsi que son potentiel thérapeutique, il permet de mettre en contexte la pertinence d'utiliser des ATC ciblant spécifiquement des antigènes présentés à la surface des cellules cancéreuses. De plus, il aborde le sujet de la relation entre l'effet GVL et la GVHD et les conséquences qu'elle peut avoir sur la sélection d'antigènes pour l'immunothérapie du cancer. Finalement, cet article aborde l'applicabilité clinique de ces thérapies et les défis qu'elles représentent.

## **2.2 Contribution des auteurs**

**Krystel Vincent** : Écriture de la première version du manuscrit, génération de la figure 2.1 et du tableau 2.1

**Denis Claude Roy** : Révision du manuscrit

**Claude Perreault** : Écriture de la première version du manuscrit

Tous les auteurs ont contribué à la révision finale du manuscrit

## 2.3 Abstract

Allogeneic hematopoietic cell transplantation led to the discovery of the allogeneic GVL effect, which remains the most convincing evidence that immune cells can cure cancer in humans. However, despite its great paradigmatic and clinical relevance, induction of GVL by conventional allogeneic hematopoietic cell transplantation remains a quite rudimentary form of leukemia immunotherapy. It is toxic and its efficacy is far from optimal. It is therefore sobering that since the discovery of the GVL effect 3 decades ago, the way GVL is induced and manipulated has practically not changed. Preclinical and clinical studies suggest that injection of T cells primed against a single Ag present on neoplastic cells could enhance the GVL effect without causing any GVHD. We therefore contend that Ag-targeted adoptive T-cell immunotherapy represents the future of leukemia immunotherapy, and we discuss the specific strategies that ought to be evaluated to reach this goal. Differences between these strategies hinge on 2 key elements: the nature of the target Ag and the type of Ag receptor expressed on T cells.

## 2.4 Introduction

The GVL reaction refers to the ability of donor immune cells to eliminate host leukemic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT). In 1956, Barnes et al<sup>1</sup> were the first to report cure of leukemia in mice after total body irradiation and AHCT. Further studies of GVL in animal models were pioneered by Bortin et al<sup>2</sup> in the 1970s<sup>3</sup>. The relevance of the GVL reaction in humans was established by the Seattle group in 1979, and key insights into its mechanisms were reported in a landmark study from the International Bone Marrow Transplant Registry in 1990<sup>4,5</sup>. Strikingly, the latter study that was based on data from 2254 subjects treated by 142 teams showed that GVL was abrogated if T cells were depleted from the graft or if the AHCT donor was an identical twin<sup>5</sup>. On the basis of these data, it was therefore inferred that GVL depended on donor T cells and on the existence of histocompatibility differences between the donor and its recipient (absent among identical twins). Because the International Bone Marrow Transplant Registry study involved HLA-identical siblings, the sole histocompatibility differences between donors and recipients were minor histocompatibility Ags (MiHAs)<sup>6</sup>. The molecular nature of MiHAs was elucidated in 1990, and the first human MiHA was sequenced in 1995<sup>7,8</sup>. Increasing recognition that cure after AHCT for leukemia is largely because of the GVL effect led to the introduction of non-myeloablative conditioning regimens and donor lymphocyte infusions (DLIs)<sup>9,10</sup>. Remarkably, DLI can eradicate  $\leq 10^{12}$  neoplastic cells in patients with chronic myelogenous leukemia,<sup>11,12</sup> and the allogeneic GVL effect represents the most convincing evidence that immunotherapy can cure human neoplasias<sup>13,14</sup>. Nowadays, AHCT can be viewed primarily as a quest for the GVL effect<sup>12</sup>. In AHC transplant recipients, the effect of GVL on leukemia-free survival is so important that it supersedes the deleterious effect of GVHD and protracted immunodeficiency.

## 2.5 After conventional AHCT, GVL results from alloreactivity

After conventional AHCT (unmanipulated graft), GVL is T-cell dependent: it is abrogated after T-cell depletion of the graft, or when the leukemic cells are MHC-deficient and therefore cannot interact with donor T cells<sup>5,15</sup>. Studies of numerous experimental models have firmly established that GVL specifically depends on recognition of host histocompatibility Ags on leukemic cells. Indeed, (1) GVL is not observed after syngeneic AHCT<sup>5</sup>; (2) when parental strain rats (A and B) were used as donors for F1 hybrid recipients (AB) bearing leukemic cells derived from parental strain A, both A and B donors induced GVHD, but only B-strain donors induced GVL<sup>16</sup>; (3) in H2<sup>b</sup> and H2<sup>bm1</sup> recipients bearing H2<sup>b</sup> leukemic cells, GVHD follows H2<sup>b</sup>→H2<sup>bm1</sup> and H2<sup>bm1</sup>→H2<sup>b</sup> AHCT, but GVL is elicited only in H2<sup>bm1</sup>→H2<sup>b</sup> AHCT<sup>17</sup>; (4) GVL can be enhanced by pre-AHCT donor immunization against host MHC or MiHA<sup>2,3</sup>; and (5) GVHD, which results from alloreactivity, correlates with low leukemic relapse rates after AHCT<sup>4,18</sup>. Two conclusions can be inferred from these studies. First, in MHC-identical donor-recipient pairs, the most common situation in human AHCT, GVL depends on donor T cells that recognize host MiHAs. Second, that GVL does not occur in the presence of GVHD targeted to Ags absent on leukemic cells<sup>16,17</sup> means that GVL requires direct interactions between donor T cells and leukemic cells and cannot be ascribed solely to paracrine (eg, cytokine-mediated) effects of GVHD.

Natural killer (NK) cells, which rapidly recover to normal blood levels after AHCT, may also contribute to the GVL effect<sup>19,20</sup>. However, for reasons that remain unclear, NK cells display antileukemic activity predominantly if not exclusively against myeloid leukemias. Depending on the context, NK cell-mediated GVL may involve MHC I-dependent and –independent mechanisms. NK cells express inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) that prevent NK-cell killing on binding to their cognate MHC I molecule on target cells. Benjamin et al<sup>20</sup> and Ruggeri et al<sup>21</sup> have shown in patients with acute myeloid leukemia (AML) treated by T cell-depleted haploidentical AHCT, that NK cells can kill AML cells that do not express the ligands for donor inhibitory KIRs. After HLA-matched AHCT (where inhibitory KIRs are irrelevant), several clinical studies suggest that expression of specific activating NK-

cell receptors on donor cells is associated with a decreased risk of AML relapse<sup>19,20,22</sup>. The nature of the (non-MHC) ligands recognized by activating NK receptors on myeloid cells remains unknown and is a subject of great interest. A more in-depth evaluation of the role of NK cells in GVL can be found in recent review articles.

### **2.5.1 Nature of MiHAs.**

MHC molecules present peptides at the cell surface. Under normal circumstances (in the absence of infection), all of these peptides originate from proteolytic degradation of cell proteins<sup>23</sup>. Some MHC-associated peptides (MAPs) are polymorphic; they are present in some persons, but in other MHC-matched subjects they are absent or present a slightly different amino acid sequence<sup>7,24</sup>. For historical reasons, polymorphic MAPs are referred to as MiHAs. They are a consequence of any form of accumulated genetic variation that hinders MAP generation (eg, gene deletion) or the structure of a MAP (eg, single nucleotide polymorphisms)<sup>6,24,25</sup>. MiHAs are essentially genetic polymorphisms viewed from a T-cell perspective.

### **2.5.2 Do leukemia-associated Ags contribute to the GVL effect?**

Hundreds of tumor Ags have been found on various types of neoplastic cells, and leukemia cells are no exception to this rule<sup>26</sup>. A comprehensive and up-to-date database on human T cell-defined tumor Ags can be found at <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>. Although some leukemia-associated Ags (LAAs) are only overexpressed on leukemic cells (relative to normal cells), other LAAs are truly specific to leukemic cells. Such Ags should therefore be seen as neo-Ags by donor T cells. Therefore, donor T cells would be expected to respond at least to some host LAAs. However, the lack of GVL in the absence of alloreactivity (eg, identical twins) means that LAAs are not sufficient to elicit curative antileukemic response after conventional AHCT. This conclusion must be tempered however, by the fact that the amount of data on GVL after syngeneic AHCT in humans remains limited. Further studies of anti-LAA immune responses in the syngeneic setting would be of great interest. Furthermore, despite the lack of direct evidence that LAAs play a role in GVL, evidence suggests that LAAs are immunogenic and might contribute to GVL initiated by MiHA-responsive T cells. Expansion of donor T cells specific



for the PR1 LAA (an HLA-A2–associated peptide derived from proteinase 3) was found after AHCT in subjects treated for chronic myelogenous leukemia<sup>27</sup>. Likewise, expansion of CD8 T cells specific for the WT1 LAA correlated with the occurrence of GVL in 10 subjects treated for acute lymphoblastic leukemia<sup>28</sup>. Moreover, recent studies provide compelling evidence that MiHA-triggered GVL initiates Ag spreading that leads to T-cell responses against LAAs and B-cell responses against differentiation Ags. Thus, after AHCT in patients with chronic lymphocytic leukemia, achievement of remission correlated with the development LAA-specific T cells and antibodies against B-cell lineage Ags<sup>29,30</sup>. Furthermore, in a human subject with melanoma, vaccination with MAGE-A Ags led to expansion of CD8 T cells specific for a tumor-specific peptide that was not present in the vaccine, and the latter T cells contributed to regression of melanoma metastases<sup>31</sup>. Finally, in an MiHA-mismatched mouse model of nonmyeloablative AHCT for treatment of prostate cancer, post-AHCT vaccination of recipients against tumor Ags enhanced the graft-versus-tumor effect, thereby suggesting that MiHA-specific T cells may collaborate with tumor-specific T cells<sup>32</sup>. Together, these studies suggest that, although alloreactivity is necessary, it may not be sufficient for effective GVL which may also require immune responses against LAAs.

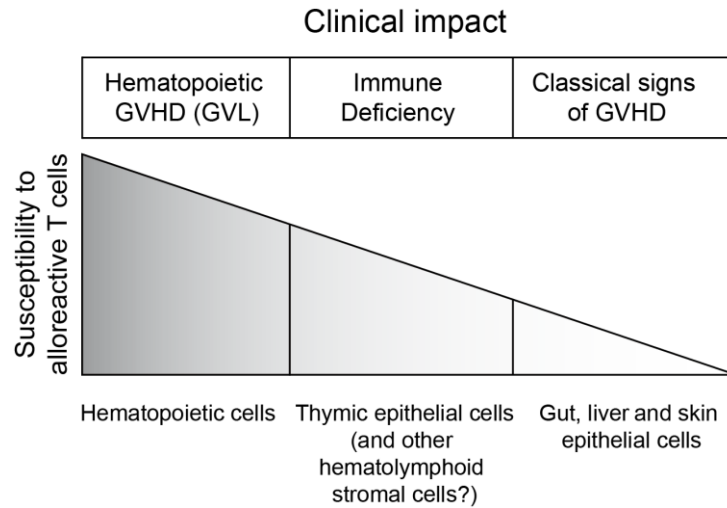
### **2.5.3 Why are T cells specific for host MiHAs more effective than LAA-specific T cells for leukemia immunotherapy? The potential role of immunoediting.**

The immune system acts as an extrinsic tumor suppressor that neoplastic cells must evade to survive. One key component of immunoevasion is immunoediting whereby neoplastic cells that express highly immunogenic tumor Ags are eliminated<sup>33</sup>. Down-regulation of immunogenic tumor Ags is used by tumor cells to evade immune surveillance<sup>34-36</sup>. According to this paradigm, leukemic cells have undergone negative selection pressure by recipient's LAA-specific T cells, and the sole leukemic cells that were “successful” are those that did not express highly immunogenic LAAs. However, before AHCT, leukemic cells have never encountered MiHA-specific T cells (which are present only in allogeneic subjects) and have not “evolved” an evasive strategy toward MiHA-specific T cells; even leukemia cells with highly immunogenic MiHAs were under no negative selection pressure. We therefore surmise that

because of immunoediting, leukemic cells are prepared to evade LAA-specific but not MiHA-specific T cells: leukemic cells do not express highly immunogenic LAAs but can express highly immunogenic MiHAs. Furthermore, with rare exceptions, donor T cells have never encountered host MiHAs and have not been tolerized against them. We therefore propose that because of immunoediting, LAAs are less immunogenic than MiHAs, explaining the overwhelming importance of MiHAs to elicit a strong GVL. This hypothesis is testable and would require comparing the immunogenicity of human MiHAs and LAAs. Nonetheless, the putative advantage of MiHAs over LAAs is not permanent: after AHCT, immunoediting may affect immune responses against leukemic cells in many ways and may lead to reduced expression of all Ags expressed on leukemic cells<sup>37</sup>.

#### **2.5.4 The relation between GVHD and GVL**

The most commonly asked question in the field of AHCT is whether GVHD and GVL can be separated. It is generally accepted that GVHD and GVL are linked but can be separated in several clinical and experimental models. We do not want to provide a comprehensive discussion of all relevant experimental models because this fundamental issue has been addressed in excellent review articles<sup>38-41</sup>. Nonetheless, we would like to address the GVHD-GVL conundrum from a different perspective by asking the following question: if both GVHD and GVL result from alloreactivity (directed specifically against MiHAs in the case of MHC-matched persons), how can alloreactive T cells spare normal cells (no GVHD) and kill leukemic cells (GVL)? We propose a simple answer that integrates data from numerous reports. We posit that the susceptibility to alloreactive T cells is different for various cell types and can be ranked as follows: hematolymphoid cells > thymic epithelial cells > epithelial cells from the gut, liver, and skin > other organs that are spared by GVHD (eg, heart, kidney) (**Figure 2.1**). Implicit to this model, the clinical correlates of hematolymphoid GVHD are complete donor chimerism and GVL, whereas destruction of thymic epithelial cells causes immune deficiency, and damage to other epithelial cells leads to typical clinical signs of GVHD.



**Figure 2.1. Schematic working model for the relation between susceptibility to alloreactive T cells and GVHD and GVL.** Of note, organs such as the heart and kidney are spared by GVHD and are therefore not shown in this figure.

The idea that hematolymphoid cells are more sensitive than other cell types to alloreactive T cells is supported by several observations: (1) in patients who do not receive any myeloablative regimen and have GVHD induced by blood transfusion, pancytopenia (because of BM aplasia) is the main cause of death<sup>42</sup>; (2) likewise, in mouse models of AHCT where nonmyeloablated recipients receive allogeneic lymphoid cells (but not hematopoietic progenitors), pancytopenia is the first sign of GVHD<sup>43,44</sup>; (3) after conventional AHCT, the rate of clearance of recipients' hematolymphoid cells in the early posttransplantation period predicts the occurrence of GVHD in humans<sup>45</sup>; and (4) after DLI, conversion from mixed chimerism to full donor chimerism (elimination of host hematolymphoid cells) is an absolute prerequisite for the occurrence GVL and is often but not always followed by “epithelial GVHD”<sup>12</sup>.

Proliferation of alloreactive T cells is initiated in secondary lymphoid organs<sup>46</sup>. Activated T cells must then extravasate from secondary lymphoid organs and infiltrate epithelia to cause GVHD<sup>47</sup>. The thymic epithelium is excessively sensitive to damage even by very small numbers of alloreactive cells that can be detected in the thymus as early as days 2 or 3 after AHCT<sup>48,49</sup>. Thymic GVHD of course hampers immune reconstitution<sup>50,51</sup>. In addition, thymic failure is a watershed event that enhances GVHD in 2 ways: by preventing generation of natural CD4 regulatory T cells that mitigate GVHD<sup>52-54</sup> and by allowing thymic export of host-reactive T cells that have not undergone proper negative selection<sup>55</sup>. Alike thymic epithelial cells,

stromal cells in other hematolymphoid organs are damaged by alloreactive T cells. Thus, after MHC-mismatched AHCT, alloreactive CD4 T cells were found to rapidly eliminate BM osteoblasts<sup>56</sup>. Destruction of osteoblasts and of other constituents of the hematopoietic stem cell niche (eg, Nestin<sup>+</sup> mesenchymal stem cells<sup>57</sup>) could contribute to GVHD-associated BM hypoplasia. In addition, evidence suggests that GVHD-induced damage to the stroma of secondary lymphoid organs hampers reconstitution of peripheral T-cell pools: T cells from lymphopenic GVHD<sup>+</sup> mice are able to expand normally when transferred into GVHD<sup>-</sup> mice, but injection of T cells from healthy donors does not correct the T-cell deficit of GVHD<sup>+</sup> mice<sup>50</sup>. Finally, host-reactive T cells infiltrate many target organs such as the skin, liver, and gastrointestinal tract; recruit other cell types; and orchestrate complex immunopathologic events<sup>58-60</sup>.

In the proposed model, GVL induced by conventional AHCT simply results from hematolymphoid GVHD. Accordingly, the question of whether GVL can be separated from GVHD might be formulated differently: can GVHD be limited to the hematolymphoid compartment? We believe that models reporting on preservation of GVL without GVHD essentially represent systems in which GVHD occurs but remains limited to hematolymphoid cells. An attractive way to dampen alloreactivity and thereby limit GVHD to the hematolymphoid compartment is to manipulate the numbers of regulatory T cells<sup>61,62</sup>. However, as long as we are unable to separate alloreactive T cells that mediate GVHD and GVL, transforming a graded phenomenon (the strength of alloreactivity) into a binary output (hematolymphoid GVHD but no systemic GVHD) may remain difficult.

## 2.6 From conventional AHCT to Ag-specific adoptive T-cell immunotherapy

The term adoptive T-cell immunotherapy (ATCI) refers to transfusion of T lymphocytes that may come from different types of donors: the patient (autologous), a genetically identical donor (syngeneic), or a nonidentical donor (allogeneic). Conventional AHCT represents a simple form of ATCI because it involves transfer of unselected T cells. Despite its great paradigmatic and clinical relevance, the GVL effect induced under these conditions is still a quite rudimentary form of leukemia immunotherapy. First, it lacks specificity and is therefore highly toxic; unselected allogeneic T cells react against a multitude of host MiHAs and thereby induce GVHD in 60% of recipients. Second, it induces only an attenuated form of GVL reaction because donor T cells are not being primed (preactivated) against specific Ags expressed on leukemic cells before injection into the patient. Although primed T cells are resistant to tolerance induction, naive T cells can be tolerized by tumor cells<sup>63-66</sup>.

More recently, ATCI with Ag-specific “activated” T cells has been used, mainly in 3 distinct settings. First, autologous T cells harvested from tumors (and presumably specific for tumor Ags) and expanded *in vitro* in the presence of IL-2 are being used for treatment of metastatic human solid tumors<sup>67,68</sup>. Second, ATCI with allogeneic CD8 T cells directed against viral Ags (expanded *in vitro* in the presence of their cognate Ag) is used with great success for treatment of human CMV, EBV, and adenovirus infection<sup>69,70</sup>. Finally, the use of allogeneic MiHA-specific T cells for cancer treatment has been evaluated in animal models and a landmark phase 1 clinical study<sup>71-73</sup>. It must be stressed that the goal in ATCI is not to discover a “one size fits all” off the shelf blockbuster. It would be impossible to treat all hematologic malignancies by targeting the same Ag in all patients. ATCI should rather be considered as a form of personalized medicine in which the target epitope is determined by the HLA genotype of the subject and the proteome of the leukemic cells. For example, the PR-1 LAA is present uniquely on myeloid leukemic cells from HLA-A2<sup>+</sup> subjects, and the HA-3 MiHA is expressed only on cells from HLA-A1 subjects bearing the R allele of the *KIAA0020* gene<sup>24,27</sup>. Because of these constraints, ATCI has been an academic endeavor led by a few centers with no input from large companies. We hope that things will change in the future, but, for the time being, cellular

immunotherapy in general and ATCI in particular remain mostly academic enterprises. We therefore deem it important to present a tentative frame for translational research in ATCI of leukemia. To this end, we summarize herein the key insights gained from preclinical and clinical studies and present the different Ag-specific ATCI approaches that need to be explored for next-generation leukemia immunotherapy. The key features of these various approaches are summarized in **Table 2.1**. For the sake of brevity, we limit our discussion to ATCI with Ag-specific T cells and refer the reader to seminal articles for discussion of 2 other promising strategies for leukemia immunotherapy: injection of allogeneic NK cells and manipulation of regulatory T cells<sup>21,61</sup>.

**Table 2.1. Key features of different strategies for ATCI of leukemic**

Key features	Ag receptor				
	Endogenous TCR		Transfected TCR		CARs
	MiHAs*	LAAs*	MiHAs*	LAAs*	Cell-surface molecules*
MHC restricted	+	+	+	+	-
Dependent on the recipient's MiHA genotype	+	-	+	-	-
Dependent on LAA expression by leukemic cells	-	+	-	+	-
Requires massive in vitro expansion of Ag-specific T cells	+	+	-	-	-
Ag receptor is monoclonal	-	-	+	+	+
Limited to cell-surface molecules (generally not leukemia specific)	-	-	-	-	+
Target Ag can originate from all cell compartments	+	+	+	+	-
T cells can be allogeneic or autologous	-†	+	+	+	+

\* Target Ag.  
† Allogeneic T cells are required.

### 2.6.1 *Ex vivo* generation of fit MiHA- and LAA-specific T cells

In healthy preimmune subjects, T cells that can recognize MiHAs and LAAs are mostly if not exclusively in the naive T-cell compartment. The frequency of Ag-specific T cells in naive persons is  $\sim 10^{-5}$ , and  $\sim 10^9$  T cells are needed for ATCI of leukemia<sup>72,74</sup>. This means that Ag-specific ATCI requires massive expansion of Ag-specific T cells, which has to be performed *ex vivo* in humans. Unfortunately, most methods for *ex vivo* expansion lead to an exhaustion of Ag-primed T cells<sup>72,75</sup>. Exhausted T cells have shortened telomeres and lose functional attributes in a hierarchical manner, beginning with the ability to produce IL-2 and to proliferate *in vivo*<sup>76</sup>. That is a big drawback because a major study of ATCI in patients with metastatic melanoma

has shown that objective antitumor response correlated with longer telomeres of the infused cells and their long-term persistence *in vivo*<sup>77</sup>. After Ag stimulation, the fittest T cells in terms of self-renewal potential are memory stem cells (T<sub>SCM</sub>, CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>Sca-1<sup>hi</sup>CD122<sup>hi</sup>Bcl-2<sup>hi</sup>) and, to a lesser extent, central memory T cells (T<sub>CM</sub>, CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup>)<sup>78,79</sup>. The challenge here is therefore to develop *ex vivo* culture conditions that promote expansion of T<sub>SCM</sub> and T<sub>CM</sub> as opposed to effector memory T cells (T<sub>EM</sub>, CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>). Recent reports suggest that 2 strategies may help achieve this goal. First, Gattinoni et al<sup>80</sup> have found that induction of Wnt-β-catenin signaling blocked differentiation of CD8 T cells into T<sub>EM</sub> and promoted the generation of T<sub>SCM</sub> with substantial proliferative and antitumor properties. Second, 2 teams have reported that provision of specific metabolic conditions during Ag stimulation (eg, inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway or modulation of fatty acid metabolism) may promote the generation of memory as opposed to effector T cells<sup>81,82</sup>. Further studies are needed to evaluate the merits of these various approaches for *ex vivo* generation of clinically relevant numbers of fit Ag-specific T<sub>CM</sub> and T<sub>SCM</sub>.

Another attractive strategy for *ex vivo* production of MiHA- or LAA-specific T cells is to transfect Ag-specific TCRs in polyclonal T-cell populations. This approach has 2 main advantages: it minimizes the need for T-cell expansion and it is flexible because TCR transgenes can be inserted in a variety of autologous or allogeneic T-cell subsets<sup>79,83</sup>. Transfecting MiHA-specific TCRs into autologous T cells would obviate the need for an allogeneic donor. Care must be taken, however, to avoid host reactivity that might result from mispairing of introduced TCR chains with endogenous TCR chains<sup>84</sup>. In addition, it is noteworthy that the T-cell population reactive to any given Ag is usually diversified and contains polyclonal TCRs. It is therefore theoretically possible that ATCI with monoclonal TCRs might be less effective than with polyclonal TCRs. Furthermore, the specific T-cell subset in which TCR should be inserted remains controversial. A report from Hinrichs et al<sup>85</sup> suggests that when autologous cells are used for ATCI, naive T cells offer the best potential. Relative to T<sub>CM</sub> and T<sub>EM</sub>, naive T cells retained longer telomeres and displayed minimal signs of exhaustion. However, injection of (TCR-transfected) allogeneic naive T cells might be dangerous because GVHD is induced primarily by naive (MiHA-responsive) T cells<sup>86</sup>. For allogeneic cells, TCR transfection into T<sub>CM</sub> might therefore represent a safer alternative<sup>79,87</sup>.

## 2.7 MiHA-targeted ATCI of leukemia

### 2.7.1 GVL mediated by T cells specific for a single MiHA

Estimates based on mouse data suggest that the number of MiHA differences between 2 persons may be ~ 30-50<sup>6,88,89</sup>. This raises the question, how many MiHAs must be recognized or targeted to induce GVHD and GVL? When T cells reactive to a single host MiHA were injected into irradiated recipient mice, no GVHD has ever been observed. This test has been done with 25 different MiHAs, using naive donors or donors specifically primed against the target MiHA<sup>71,90,91</sup>. Hence, at least in mice, it is impossible to induce GVHD by injecting T cells targeted to a single MiHA, even when the MiHA is ubiquitously expressed. The number of MiHAs that need to be recognized to elicit GVHD is unknown. By contrast, T cells primed against a single MiHA can eradicate leukemic cells as long as the target MiHA is immunodominant (highly immunogenic)<sup>71,92</sup>. Of note, the innocuity of T cells targeted to a single minor was recently challenged when Warren et al<sup>72</sup> documented lung injury in 3 recipients of anti-MiHA CD8 T-cell clones. The T-cell clones had been expanded *in vitro* in the presence of anti-CD3 Ab and IL-2. Whether lung toxicity in these subjects resulted from cognate interactions of the T-cell clones with the lung parenchyma as opposed to some non-Ag-specific toxicity of the activated T cells remains a matter of conjecture. Indeed, T cells expanded *in vitro* in the presence of IL-2 can cause lung toxicity by TCR-independent mechanisms, by launching an inflammatory reaction in the first organ where they are trapped<sup>93,94</sup>. Nevertheless, on the basis of the report by Warren et al<sup>72</sup> it would appear hazardous to treat patients with T cells whose target Ag is expressed in the lungs.

H7<sup>a</sup> (formerly B6<sup>dom1</sup>), the first immunodominant MiHA discovered in mice, has been studied extensively<sup>95,96</sup>. H7 allelic products originate from a single nucleotide polymorphism in the *Stt3b* gene. The sequence of the H7 peptide is KAPDNRETL in H7<sup>a+</sup> mice (eg, C57BL/10) and KAPDNRDTL in H7<sup>b+</sup> mice (eg, C3H.SW)<sup>96</sup>. Injection of anti-H7<sup>a</sup> T cells cured not only leukemia but also established melanoma<sup>71,73</sup>. Eradication of melanoma cells depended on 2 T-cell effector mechanisms: direct killing of neoplastic cells by granule exocytosis and inhibition of angiogenesis by IFN- $\gamma$ . Importantly, even though H7<sup>a</sup> is ubiquitously expressed, injection of



anti-H7<sup>a</sup> T cells caused neither GVHD nor any untoward toxicity (eg, vitiligo) to recipients. The efficacy and innocuity of anti-H7<sup>a</sup> T cells are explained, at least in part, by the fact that anti-H7<sup>a</sup> effector T cells express high levels of V1a-4<sup>73</sup>, and that the ligand of V1a-4 (Vcam-1) is expressed almost exclusively on BM microvessels and tumor neovessels. Therefore, anti-H7<sup>a</sup> effector T cells extravasate primarily in the BM and the tumor bed, where, in the presence of their target MiHA, they proliferate rapidly and extensively and kill neoplastic cells<sup>73,97,98</sup>. It should be of interest to determine whether up-regulation of V1a-4 is a general feature of MiHA-specific effector cells and whether Vcam-1–dependent homing of MiHA-reactive T cells to the BM and solid tumors might explain that hematopoietic cells (**Figure 2.1**) and solid tumors are particularly susceptible to MiHA-specific T cells<sup>73</sup>. The notion that solid tumors can be more susceptible to T-cell attack than non-hematopoietic cells has been supported in a study in which mice with intracranial melanoma were immunized against a melanoma-associated Ag, dopachrome tautomerase, which normal melanocytes and glial cells also express. Quite remarkably, immunotherapy led to rejection of intracranial tumor cells without damaging the brain despite sharing the target Ag<sup>99</sup>. Although the mechanisms regulating the susceptibility of nonhematopoietic tissues and tumors to T-cell attack have yet to be worked out, studies on H7<sup>a</sup> and dopachrome tautomerase suggest that, at least in certain contexts, solid tumors may be unduly sensitive to T-cell attack.

In a phase 1 study reported in 2010, 7 patients with recurrent leukemia after AHCT were treated with donor-derived *ex vivo*–expanded MiHA-specific CD8 T-cell clones. Two salient findings emerged from that study<sup>72</sup>. First, injected T cells migrated to the BM, and 5 of 7 patients achieved complete remission. However, adoptively transferred T cells failed to persist *in vivo* and remissions were transient. This important study shows that T cells targeted to a single MiHA can induce a potent GVL reaction in humans. However, it also shows that current methods for *ex vivo* expansion of T cells specific for noninfectious epitopes are inadequate.

## 2.7.2 Discovery of human MiHAs

Studies of leukemia immunotherapy with anti-H7<sup>a</sup> CD8 T cells suggest that it may be possible to obtain a strong GVL without GVHD by targeting MiHAs that have a wide tissue distribution. However, we believe that MiHAs with a wide tissue distribution are not ideal

targets; “Ag excess” promotes functional exhaustion and physical demise of MiHA-reactive T cells<sup>98,100</sup>. Thus, ideal targets would be MiHAs expressed on hematopoietic cells<sup>101</sup>. At the present time, only 30% of patients with leukemia would be eligible for hematopoietic MiHA-based ATCI because of the limited number of human MiHAs that have been molecularly characterized<sup>102</sup>. Hence, it is imperative to develop and exploit high-throughput methods for MiHA discovery<sup>103,104</sup>.

### **2.7.3 Is a single Ag target sufficient for successful ATCI of leukemia?**

Irrespective of the nature of the Ag (MiHA, LAA, cell-surface molecule), it may seem surprising that targeting a single Ag would be sufficient to cure leukemia or other types of cancer. A priori, injection of monospecific T cells should increase the risk of immune escape by selection of Ag loss variants. However, we contend that infiltration of the BM or solid tumors by activated T cells specific for a single Ag launches 2 series of events that facilitate eradication of all neoplastic cells, including Ag loss variants: angiostasis and epitope spreading. First and foremost, although all neoplasias (including leukemias) depend on generation of neovessels, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  secreted by activated T cells are perhaps the most potent antiangiogenic molecules available. As a consequence, secretion of these 2 cytokines in the tumor bed leads to ischemic death of neoplastic cells and bystander eradication of Ag loss variants<sup>73,105,106</sup>. Notably, the antiangiogenic effect of IFN- $\gamma$  was essential for eradication of melanoma cells by anti-H7<sup>a</sup> T cells<sup>73</sup>. Second, in several models killing of tumor cells by cytotoxic T lymphocytes initiates Ag spreading, that is, priming and recruitment and of T-cell clones specific for Ags (MiHA and LAAs) different from the initial Ag target<sup>29,31,32</sup>. Ag spreading can even extend to B-cell responses against cell-surface molecules<sup>30</sup>.

Nevertheless, an alternative approach to leukemia immunotherapy pioneered by Bordignon et al<sup>107,108</sup> has also yielded promising results: injection of polyclonal allogeneic lymphocytes transduced to express a suicide gene. Expression of a suicide gene confers to cells sensitivity to a molecule (prodrug) that is nontoxic to nonexpressing cells. Thus, when recipients of genetically modified lymphocytes present signs of GVHD, the prodrug is administered to

terminate the antihost alloreaction. In essence, this strategy exploits the fact that hematopoietic cells are more susceptible than epithelial cells to attack by alloreactive T cells and that brisk termination of GVHD may not totally abrogate the GVL reaction (**Figure 2.1**). In a landmark study, 23 patients received donor lymphocyte infusions with lymphocytes transduced to express the *HSV-TK* suicide gene for relapse of hematologic malignancies occurring after AHCT<sup>107</sup>. Suicide gene transfer is safe and allows at least for some level of GVL activity, but it is limited by the development of transgene-specific CD8 T-cell immune responses that limit the *in vivo* persistence of genetically modified cells<sup>107,109</sup>. Therefore, several new cell and gene transfer approaches are being evaluated in phase 1-2 clinical studies<sup>108</sup>.

## 2.8 LAA-targeted ATCI of leukemia

The lack of evidence that LAAs contribute to the GVL after conventional AHCT suggest that naive LAA-specific T cells are not sufficient to elicit curative antileukemic responses. Therefore, ATCI of leukemia with LAA-specific T cells remains largely unexplored. However, it remains possible that activated LAA-specific T cells may have more potent antileukemic activity than naive LAA-reactive T cells. Consistent with this, impressive results in patients with solid tumors treated by tumor Ag-targeted ATCI<sup>83,110,111</sup> suggest that leukemia immunotherapy with LAA-primed T cells might have significant therapeutic potential. TCRs recognize MHC-associated peptides. Whether the peptide is an MiHA or an LAA, recognition by TCRs is MHC restricted. Accordingly, ATCI that is based on TCR recognition of LAA peptides is fraught with caveats similar to those encountered with MiHA-based ATCI (**Table 2.1**): (1) the need for individualized Ag targeting; LAA targeting must be tailored according to the HLA genotype and the proteome of leukemic cells; and (2) irrespective of whether endogenous TCRs or transfected TCRs are used, generation of large numbers of fit LAA-specific T cells will be demanding. However, if high-frequency immunogenic LAAs are found, donor selection for LAA-targeted ATCI would be easier than for MiHA-targeted ATCI. In the case of LAA, any HLA-matched subject is a potential donor, whereas when targeting MiHAs, the donor must be HLA-matched and negative for the target MiHA. Furthermore, in the case of ATCI with non-TCR-transfected T cells, LAAs present another advantage over MiHAs: LAA-specific T cells can be generated from autologous T cells and do not require an allogeneic donor. To this end, it

might be advantageous to expand LAA-specific T cells from *ex vivo*-generated naive autologous T cells that have not been subjected to immunoediting *in vivo*<sup>112</sup>. However, T cells from a healthy allogeneic donor may have an advantage over autologous T cells: healthy subjects that have not been subjected to chemotherapy may have a superior thymic function and a more diversified T-cell repertoire<sup>113</sup>.

## 2.9 Targeting cell surface molecules with chimeric Ag receptors (CARs)

To circumvent the problem of MHC restriction inherent to targeting TCR epitopes, an alternative strategy is now being explored by several groups: targeting cell-surface molecules present on leukemic cells with T cells transfected with chimeric Ag receptors (CARs). CARs are typically composed of fusion proteins between single-chain variable fragments from monoclonal antibodies and intracellular signaling domains such as the CD3 $\zeta$ -chain<sup>114,115</sup>. Thus, CAR-expressing T cells see the world like B cells but react like T cells. Adoptive transfer of autologous anti-CD19-CAR-expressing T cells recently led to regression of a B-cell lymphoma (and of normal CD19+ cells) in a patient, providing a proof of principle that CARs represent a promising approach<sup>116</sup>. Accordingly, anti-CD19-CARs are generating substantial enthusiasm, and their value will probably be evaluated in a multiple institutional trial<sup>115</sup>. MHC-independent Ag recognition makes CARs broadly applicable. However, there is a significant caveat in seeing the world with a CAR (ie, with an Ab): you can only see cell-surface Ags. This is problematic because cell-surface Ags that are truly leukemia specific and can be recognized by Abs are exceedingly rare. In contrast, because TCRs recognize peptides derived from all cell compartments<sup>117,118</sup>, all leukemic cells presumably express MHC-restricted targets (MiHAs and LAAs).

## 2.10 Perspective

The division of labor between B cells and T cells was recently found to be conserved in jawless and jawed vertebrates, in a remarkable example of convergent evolution<sup>119</sup>. Over the past 500 million years, survival of all vertebrates on this planet has depended on a combination TCR- and Ab-mediated recognition. We anticipate that both recognition systems will prove valuable in ATCI of leukemia. Nonetheless, development of next-generation leukemia immunotherapy is fraught with 2 main obstacles. The first is “philosophical”: the vestigial (and soon obsolete) reluctance to move from blockbuster medicine to personalized medicine. The second is methodologic: we need to develop reliable methods for *ex vivo* generation of large numbers of fit Ag-specific T cells. We can envision many strategies that differ with regard to the nature of the target Ag and the type of Ag receptor expressed on T cells (**Table 2.1**). However, it would be impossible to evaluate *in vivo* the fitness of T cells generated with all Ag/receptor combinations. We therefore need to establish reliable criteria for *in vitro* prediction of *in vivo* T-cell fitness. We propose as a working hypothesis that after *in vitro* priming and expansion, it might be possible to predict the fitness of Ag-primed T cells by estimating their telomere length and polyfunctionality index (eg, expression of CD107, CCL4, and TNF $\alpha$ ; production of IFN- $\gamma$  and IL-2)<sup>77,120</sup>.

## **2.11 Acknowledgements and conflicts of interest**

KV is supported by a studentship from the Cole Foundation. Work on leukemia immunotherapy in the authors' lab has been supported by grants from the Canadian Cancer Society (to CP) and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (to DCR). CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology.

The authors declare that there is no conflict of interest. There is also no non-author involvement in the preparation of a manuscript.

## 2.12 References

1. Barnes, D.W. and J.F. Loutit, *Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II.* Br J Haematol, 1957. **3**(3): p. 241-52.
2. Bortin, M.M., et al., *Graft-versus-leukaemia reactivity induced by alloimmunisation without augmentation of graft-versus-host reactivity.* Nature, 1979. **281**(5731): p. 490-1.
3. Truitt, R.L., *The Mortimer M. Bortin Lecture: to destroy by the reaction of immunity: the search for separation of graft-versus-leukemia and graft-versus-host.* Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**(8): p. 505-23.
4. Weiden, P.L., et al., *Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts.* N Engl J Med, 1979. **300**(19): p. 1068-73.
5. Horowitz, M.M., et al., *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.* Blood, 1990. **75**(3): p. 555-62.
6. Perreault, C., et al., *Minor histocompatibility antigens.* Blood, 1990. **76**(7): p. 1269-80.
7. Rotzschke, O., et al., *Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y.* Science, 1990. **249**(4966): p. 283-7.
8. den Haan, J.M., et al., *Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen.* Science, 1995. **268**(5216): p. 1476-80.
9. Kolb, H.J., et al., *Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients.* Blood, 1995. **86**(5): p. 2041-50.
10. Bethge, W.A., et al., *Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning.* Blood, 2004. **103**(3): p. 790-5.
11. Collins, R.H., Jr., et al., *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation.* J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 433-44.
12. Kolb, H.J., et al., *Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras.* Blood, 2004. **103**(3): p. 767-76.
13. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 371-80.
14. Gyurkocza, B., et al., *Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia.* J Clin Oncol, 2010. **28**(17): p. 2859-67.



15. Matte-Martone, C., et al., *CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells require direct leukemic contact to mediate GVL*. *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3884-92.
16. Kloosterman, T.C., et al., *Graft-versus-leukemia in rat MHC-mismatched bone marrow transplantation is merely an allogeneic effect*. *Bone Marrow Transplant*, 1995. **15**(4): p. 583-90.
17. Reddy, P., et al., *A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses*. *Nat Med*, 2005. **11**(11): p. 1244-9.
18. Thepot, S., et al., *The graft-versus-leukemia effect is mainly restricted to NIH-defined chronic graft-versus-host disease after reduced intensity conditioning before allogeneic stem cell transplantation*. *Leukemia*, 2010. **24**(11): p. 1852-8.
19. Barrett, A.J., *Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect*. *Br J Haematol*, 2008. **142**(6): p. 877-88.
20. Benjamin, J.E., S. Gill, and R.S. Negrin, *Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation*. *Curr Opin Oncol*, 2010. **22**(2): p. 130-7.
21. Ruggeri, L., et al., *Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 433-40.
22. Cooley, S., et al., *Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2010. **116**(14): p. 2411-9.
23. Perreault, C., *The origin and role of MHC class I-associated self-peptides*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2010. **92**: p. 41-60.
24. Spierings, E., et al., *Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(6): p. e103.
25. Roopenian, D., E.Y. Choi, and A. Brown, *The immunogenomics of minor histocompatibility antigens*. *Immunol Rev*, 2002. **190**: p. 86-94.
26. Rezvani, K., et al., *Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8<sup>+</sup> T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation*. *Blood*, 2003. **102**(8): p. 2892-900.
27. Mollrem, J.J., et al., *Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia*. *Nat Med*, 2000. **6**(9): p. 1018-23.

28. Rezvani, K., et al., *Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1924-32.
29. Nishida, T., et al., *Development of tumor-reactive T cells after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant for chronic lymphocytic leukemia*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(14): p. 4759-68.
30. Marina, O., et al., *Serologic markers of effective tumor immunity against chronic lymphocytic leukemia include nonmutated B-cell antigens*. Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1344-55.
31. Corbiere, V., et al., *Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1253-62.
32. Hess Michelini, R., et al., *Concomitant tumor and minor histocompatibility antigen-specific immunity initiate rejection and maintain remission from established spontaneous solid tumors*. Cancer Res, 2010. **70**(9): p. 3505-14.
33. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
34. Beatty, G.L. and Y. Paterson, *IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5502-8.
35. Sanchez-Perez, L., et al., *Potent selection of antigen loss variants of B16 melanoma following inflammatory killing of melanocytes in vivo*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 2009-17.
36. Kmiecik, M., et al., *HER-2/neu antigen loss and relapse of mammary carcinoma are actively induced by T cell-mediated anti-tumor immune responses*. Eur J Immunol, 2007. **37**(3): p. 675-85.
37. Vago, L., et al., *Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2009. **361**(5): p. 478-88.
38. Welniak, L.A., B.R. Blazar, and W.J. Murphy, *Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 139-70.
39. Kolb, H.J., *Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4371-83.
40. Jenq, R.R. and M.R. van den Brink, *Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(3): p. 213-21.

41. Pavletic, S.Z., et al., *NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: report from the Committee on the Epidemiology and Natural History of Relapse following Allogeneic Cell Transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(7): p. 871-90.
42. Dwyre, D.M. and P.V. Holland, *Transfusion-associated graft-versus-host disease*. Vox Sang, 2008. **95**(2): p. 85-93.
43. Mori, T., et al., *Involvement of Fas-mediated apoptosis in the hematopoietic progenitor cells of graft-versus-host reaction-associated myelosuppression*. Blood, 1998. **92**(1): p. 101-7.
44. Sprent, J., et al., *Profound atrophy of the bone marrow reflecting major histocompatibility complex class II-restricted destruction of stem cells by CD4+ cells*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 307-17.
45. Gyger, M., et al., *Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-vs.-host disease*. Exp Hematol, 1998. **26**(5): p. 426-34.
46. Beilhack, A., et al., *Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2919-28.
47. Brochu, S., et al., *Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5104-14.
48. Krenger, W. and G.A. Hollander, *The immunopathology of thymic GVHD*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(4): p. 439-56.
49. Na, I.K., et al., *The cytolytic molecules Fas ligand and TRAIL are required for murine thymic graft-versus-host disease*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 343-56.
50. Dulude, G., D.C. Roy, and C. Perreault, *The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1329-42.
51. Ferrara, J.L.M., K.R. Cooke, and H.J. Deeg, *Graft-vs.-host disease*. 3rd ed. 2005, New York: Marcel Dekker. xvii, 645 p.
52. Johnson, B.D., et al., *Role of immunoregulatory donor T cells in suppression of graft-versus-host disease following donor leukocyte infusion therapy*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6479-87.
53. Cohen, J.L., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 401-6.

54. Trenado, A., et al., *Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 1266-73.
55. Krenger, W., B.R. Blazar, and G.A. Hollander, *Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2011. **117**(25): p. 6768-76.
56. Shono, Y., et al., *Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2010. **115**(26): p. 5401-11.
57. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
58. Miklos, D.B., et al., *Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2973-8.
59. Socie, G. and B.R. Blazar, *Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside*. Blood, 2009. **114**(20): p. 4327-36.
60. Giroux, M., et al., *SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocyte-mediated tissue damage*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1734-44.
61. Maury, S., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Sci Transl Med, 2010. **2**(41): p. 41ra52.
62. Bastien, J.P., et al., *Photodepletion differentially affects CD4+ Tregs versus CD4+ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4859-69.
63. Inaba, M., et al., *Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1315-20.
64. Yang, J., et al., *Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19954-9.
65. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
66. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
67. Rosenberg, S.A., et al., *Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(4): p. 299-308.
68. Rosenberg, S.A. and M.E. Dudley, *Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 233-40.

69. Leen, A.M., et al., *Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1160-6.
70. Heslop, H.E., et al., *Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients*. Blood, 2010. **115**(5): p. 925-35.
71. Fontaine, P., et al., *Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 789-94.
72. Warren, E.H., et al., *Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens*. Blood, 2010. **115**(19): p. 3869-78.
73. Meunier, M.C., et al., *T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1222-9.
74. Jenkins, M.K., et al., *On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 275-94.
75. Ahmadzadeh, M., et al., *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.
76. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.
77. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.
78. Zhang, Y., et al., *Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1299-305.
79. Turtle, C.J. and S.R. Riddell, *Genetically retargeting CD8+ lymphocyte subsets for cancer immunotherapy*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(2): p. 299-305.
80. Gattinoni, L., et al., *Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells*. Nat Med, 2009. **15**(7): p. 808-13.
81. Araki, K., et al., *mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation*. Nature, 2009. **460**(7251): p. 108-12.
82. Pearce, E.L., et al., *Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism*. Nature, 2009. **460**(7251): p. 103-7.

83. Robbins, P.F., et al., *Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1*. J Clin Oncol, 2011. **29**(7): p. 917-24.
84. Bendle, G.M., et al., *Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy*. Nat Med, 2010. **16**(5): p. 565-70, 1p following 570.
85. Hinrichs, C.S., et al., *Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy*. Blood, 2011. **117**(3): p. 808-14.
86. Shlomchik, W.D., *Graft-versus-host disease*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 340-52.
87. Wang, X., et al., *Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice*. Blood, 2011. **117**(6): p. 1888-98.
88. Loveland, B. and E. Simpson, *The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor*. Immunol Today, 1986. **7**(7-8): p. 223-9.
89. Paul, W.E., *Fundamental immunology*. 6th ed. 2008, Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. xviii, 1603 p., 16 p. of plates.
90. Korngold, R., et al., *Inter-strain graft-vs.-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens*. Biol Blood Marrow Transplant, 1997. **3**(2): p. 57-64.
91. Blazar, B.R., et al., *Lack of GVHD across classical, single minor histocompatibility (miH) locus barriers in mice*. Transplantation, 1996. **61**(4): p. 619-24.
92. Pion, S., et al., *Immunodominant minor histocompatibility antigens expressed by mouse leukemic cells can serve as effective targets for T cell immunotherapy*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1561-8.
93. Law, T.M., et al., *Phase III randomized trial of interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma*. Cancer, 1995. **76**(5): p. 824-32.
94. Clark, J.G., et al., *Lung injury induced by alloreactive Th1 cells is characterized by host-derived mononuclear cell inflammation and activation of alveolar macrophages*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1913-20.
95. Perreault, C., et al., *Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 622-8.
96. McBride, K., et al., *The model B6(dom1) minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast STT3 gene*. Immunogenetics, 2002. **54**(8): p. 562-9.

97. Meunier, M.C., et al., *Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy*. Blood, 2003. **101**(2): p. 766-70.
98. Meunier, M.C., C. Baron, and C. Perreault, *Two host factors regulate persistence of H7-specific T cells injected in tumor-bearing mice*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4116.
99. Bridle, B.W., et al., *Immunotherapy can reject intracranial tumor cells without damaging the brain despite sharing the target antigen*. J Immunol, 2010. **184**(8): p. 4269-75.
100. Asakura, S., et al., *Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(7): p. 2370-8.
101. Mutis, T. and E. Goulmy, *Hematopoietic system-specific antigens as targets for cellular immunotherapy of hematological malignancies*. Semin Hematol, 2002. **39**(1): p. 23-31.
102. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(3): p. 396-407.
103. Bleakley, M., et al., *Leukemia-associated minor histocompatibility antigen discovery using T-cell clones isolated by in vitro stimulation of naive CD8+ T cells*. Blood, 2010. **115**(23): p. 4923-33.
104. Van Bergen, C.A., et al., *High-throughput characterization of 10 new minor histocompatibility antigens by whole genome association scanning*. Cancer Res, 2010. **70**(22): p. 9073-83.
105. Qin, Z., et al., *A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 4095-100.
106. Zhang, B., et al., *IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1398-404.
107. Traversari, C., et al., *The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4708-15.
108. Lupo-Stanghellini, M.T., et al., *Clinical impact of suicide gene therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(3): p. 241-50.
109. Berger, C., et al., *Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2294-302.
110. Dudley, M.E., et al., *CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(24): p. 6122-31.

111. Parkhurst, M.R., et al., *T Cells Targeting Carcinoembryonic Antigen Can Mediate Regression of Metastatic Colorectal Cancer but Induce Severe Transient Colitis*. *Mol Ther*, 2011. **19**(3): p. 620-626.
112. Awong, G., et al., *Human CD8 T cells generated in vitro from hematopoietic stem cells are functionally mature*. *BMC Immunol*, 2011. **12**: p. 22.
113. Hakim, F.T., et al., *Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(4): p. 930-9.
114. Sadelain, M., R. Brentjens, and I. Riviere, *The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(2): p. 215-23.
115. Kohn, D.B., et al., *CARs on track in the clinic*. *Mol Ther*, 2011. **19**(3): p. 432-8.
116. Kochenderfer, J.N., et al., *Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19*. *Blood*, 2010. **116**(20): p. 4099-102.
117. Fortier, M.H., et al., *The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome*. *J Exp Med*, 2008. **205**(3): p. 595-610.
118. de Verteuil, D., et al., *Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules*. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(9): p. 2034-47.
119. Guo, P., et al., *Dual nature of the adaptive immune system in lampreys*. *Nature*, 2009. **459**(7248): p. 796-801.
120. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(4): p. 247-58.



## **Chapitre 3**

**Rejection of mouse leukemic cells requires antigen-specific T cells  
with high functional avidity**

**Référence de publication:**

**Biol Blood Marrow Transplant., 2014 Jan;20(1):37-45**

### **3. Rejection of leukemic cells requires antigen-specific T cells with high functional avidity**

**Short Title:** Leukemia immunotherapy

Krystel Vincent (M.Sc.)<sup>1,2</sup>, Marie-Pierre Hardy (M.Sc.)<sup>1,2</sup>, Assya Trofimov<sup>1,2</sup> Céline M. Laumont (M.Sc.)<sup>1,2</sup>, Dev Sriranganadane (Ph.D.)<sup>1,3</sup>, Sarah Hadj-Mimoune<sup>1,2</sup>, Insaf Salem Fourati (M.Sc.)<sup>4</sup>, Hugo Soudeyns (Ph.D.)<sup>4</sup>, Pierre Thibault (Ph.D.)<sup>1,3</sup> and Claude Perreault (M.D.)<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer, <sup>2</sup>Department of Medicine, <sup>3</sup>Department of Chemistry and <sup>4</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7

**CORRESPONDENCE:**

Claude Perreault

Institute for Research in Immunology and Cancer

Université de Montréal

e-mail: (claude.perreault@umontreal.ca)

### 3.1 Mise en contexte de l'article

L'objectif de cette thèse était de mener une comparaison exhaustive du potentiel anti-leucémique des MiHA, des TAA et des TSA. Le rôle des MiHA pour l'induction de l'effet du greffon contre les leucémies lors des AHCT est incontestable. De plus, les TAA, contrairement aux TSA, possèdent l'avantage d'être exprimés dans plusieurs types de cancers. Malgré que leur utilisation pour stimuler spécifiquement les lymphocytes T n'ait démontré des résultats intéressants que dans un nombre limité d'études cliniques, l'observation de l'amplification des lymphocytes T dirigés contre ces antigènes dans divers contextes thérapeutiques justifie encore leur intérêt clinique. Ainsi, dans cet article publié en 2014, nous avons d'abord mené une étude comparative du potentiel thérapeutique des MiHA et des TAA dérivant de transcrits surexprimés dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines.

Pour ce faire, nous avons utilisés 4 TAA surexprimés sur les cellules EL4, pour lesquels la séquence a été élucidée par spectrométrie de masse. Le choix des MiHA est plus complexe puisque des réponses immunitaires ne peuvent être observées que dans un contexte allogénique, c'est-à-dire lorsque les donneurs de lymphocytes T portant le variant « b », reconnaissent des cellules cancéreuses portant le variant « a ». Ainsi, nous avons sélectionnés 4 MiHA de séquence connus (H3<sup>a</sup>, H4<sup>a</sup>, H7<sup>a</sup> and H13<sup>a</sup>), pour lesquels des souches de souris congéniques aux souris C57BL/6 étaient disponibles. Ce faisant, nous avons été en mesure d'immuniser les souris portant le variant « b », contre les antigènes portant le variant « a » présenté à la surface des cellules EL4.

## 3.2 Contribution des auteurs

**Krystel Vincent** : Conception du projet, mise en place et exécution des expériences, analyse des résultats menant au tableau 1 et aux figures 1 à 6 et S1, écriture de la première version du manuscrit.

**Marie-Pierre Hardy** : Aide à la mise en place et exécution des expériences menant à la génération des figures 1, 2, 4 et 6

**Assya Trofimov** : Revue de littérature menant à la génération du tableau S1

**Céline M. Laumont et Dev Sriranganadane** : Mise en place et à exécution de l'expérience et analyse des résultats menant à la génération de la figure 5a

**Sarah Hadj-Mimoune** : Aide à la mise en place et exécution des expériences menant à la génération de la figure 5b et c

**Insaf Salem Fourati et Hugo Soudeyns** : Participation à l'analyse des résultats des expériences menant aux figures 3c, 3d et 6a

**Pierre Thibault** : Analyse des résultats

**Claude Perreault** : Conception du projet, analyse des résultats et rédaction de la première version du manuscrit

Tous les auteurs ont contribué à la révision finale du manuscrit

### **3.3 Financial disclosure statement**

This study was funded by the Canadian Cancer Society Research Institute (grant # 701564).

There are no conflicts of interest to report.

### 3.4 Abstract

In a context where injection of antigen (Ag)-specific T cells probably represents the future of leukemia immunotherapy, identification of optimal target Ags is crucial. We therefore sought to discover a reliable marker for selection of the most potent Ags. To this end, (1) we immunized mice against 8 individual Ags: 4 minor histocompatibility Ags (MiHAs) and 4 leukemia-associated Ags (LAAs) that were overexpressed on leukemic relative to normal thymocytes; (2) we assessed their ability to reject EL4 leukemic cells; and (3) we correlated the properties of our Ags (and their cognate T cells) with their ability to induce protective antileukemic responses. Overall, individual MiHAs instigated more potent antileukemic responses than LAAs. Three features had no influence on the ability of primed T cells to reject leukemic cells: (1) MHC-peptide affinity; (2) the stability of MHC-peptide complexes; and (3) epitope density at the surface of leukemic cells, as assessed using mass spectrometry. The cardinal feature of successful Ags is that they were recognized by high-avidity CD8 T cells that proliferated extensively *in vivo*. Our work suggests that *in vitro* evaluation of functional avidity represents the best criterion for selection of Ags, which should be prioritized in clinical trials of leukemia immunotherapy.

### 3.5 Introduction

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT) led to the discovery of the allogeneic graft-versus-leukemia (GVL) effect, which remains the most convincing evidence that immune cells can cure cancer in humans<sup>1-3</sup>. After conventional HLA-matched AHCT, GVL is clearly mediated by donor T cells that use several cytotoxic mechanisms to kill leukemic cells<sup>4-8</sup>. T cells from an allogeneic (nonidentical twin) HLA-matched donor can react to both leukemia-associated Ags (LAAs) and minor histocompatibility Ags (MiHAs) on recipient cells, whereas an identical twin (syngeneic) donor can react to LAAs but not MiHAs. MiHAs are polymorphic MHC-associated peptides that result from genetic variations such as single nucleotide polymorphisms<sup>9-12</sup>. Strikingly, in mice and humans, the GVL effect is abrogated when the donor is syngeneic. There is, therefore, general agreement that after conventional AHCT, the GVL effect depends on direct recognition of host MiHAs by donor T cells<sup>1,2,8,13-19</sup>.

Nonetheless, even though the GVL effect after conventional AHCT is clearly MiHAs dependent, evidence suggests that LAAs are immunogenic and might contribute to GVL initiated by MiHAs-responsive T cells. Expansion of donor T cells specific for PR1 and WT1 was observed post-AHCT, and, in the case of WT1, correlated with the occurrence of GVL<sup>20,21</sup>. Moreover, evidence suggests that MiHAs-triggered GVL initiates Ag spreading that leads to T cell responses against LAAs<sup>2</sup>. Finally, overall comparisons between MiHAs and LAAs may not be fair. Though exact numbers are not known, estimates suggest that the number of different MiHAs that can be recognized by allogeneic T cells may be as high as 100<sup>12,22</sup>, whereas the number of immunogenic LAAs expressed by a population of leukemic cells is probably less than 10<sup>23,24</sup>. Therefore, GVL might appear to be dependent on MiHAs simply because donor T cells are confronted with a larger repertoire of MiHAs than LAAs. Consequently, there is no evidence that on a per Ag basis, there are differences in the antileukemic activity of T cells targeted to LAAs versus MiHAs<sup>25,26</sup>. In a context where injection of Ag-specific T cells probably represents the future of leukemia immunotherapy<sup>2</sup>, identification of the best targets is of capital importance. If, on a per Ag basis, LAAs are as effective as MiHAs, then targeting LAAs would be preferable because autologous T cells could be used. The superiority of MiHAs would require the use of allogeneic donors. The goal of the present work was, therefore, to investigate the rules determining whether an Ag (MiHAs or LAA) is a good target for leukemia

immunotherapy. We sought to directly address this question using a straightforward approach: (1) we immunized mice against 8 individual Ags (4 MiHAs and 4 LAAs), and we then assessed their ability to reject EL4 leukemic cells; and (2) we compared the properties of these Ags (and their cognate T cells) to discover which features correlated with antileukemic activity *in vivo*. To the best of our knowledge, our work provides the first direct comparison of antileukemic responses induced by individual MiHAs and LAAs. We report that, overall, individual MiHAs generated much more potent antileukemic responses than LAAs. *In vivo* antileukemic activity was dictated by the functional avidity of Ag-reactive T cells and not by epitope density on leukemic cells nor by the strength of peptide-MHC (pMHC) interactions.



## 3.6 Materials and methods

### *Mice*

B10.C-H7b/Sn (B10.H7b), B10.LP- H3b H13b/(36NS)Sn (B10.H3b/H13b), B10.129P-H46b H47b/(21M)Sn (B10.H4b), C57BL/10J (B10) and C57BL/6 (B6) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). B10.H7b, B10.H3b/H13b, and B10.H4b mice are referred to as B10-congenetic mice. Mice were housed under specific pathogen-free conditions and all experimental protocols were approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur des Animaux of Université de Montréal.

### *Peptides*

Native peptides and FITC-conjugated peptides (SII[Lys-FITC]FEKL) and (ASP[Lys-FITC]NSTVL) were synthesized by GenScript (Piscataway, NJ). Purity, as determined by the manufacturer, was greater than 95%. <sup>13</sup>C-versions of VAAANR\*EVL, STLTYSR\*M and KAPDNR\*ETL peptides were synthesized by JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany).

### *Cell lines*

The EL4 lymphoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and was cultured in DMEM supplemented with 10% horse serum. RMA-S cells, provided by Dr. Sylvie Lesage (Université de Montréal), were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and .048 mmol/L β-mercaptoethanol. Cell cultures were supplemented with 2 mmol/L L-glutamine and 2 mmol/L penicillin-streptomycin.

### *Preparation of bone marrow-derived dendritic cells (DCs), mouse immunization and survival curves*

Bone marrow-derived DCs were generated as previously described<sup>27</sup>. For mouse immunization, DCs from male mice were pulsed with the selected peptide (2 μM) for 3 hours. Cells were washed and injected i.v. (10<sup>6</sup> cells per mice) in 8- to 16-week-old female mice on day -14 and day -7. On day 0, EL4 cells were harvested, washed 3 times in PBS, and injected i.v. Mice were monitored for loss of weight, paralysis, or tumor outgrowth. B10-congenetic and B6 female mice were used to generate MiHAs- and LAA-specific CD8 T cells, respectively. As

negative controls, B6, B10, or B10-congenetic female mice were immunized with unpulsed DCs derived from syngeneic mice.

### ***Cell sorting, flow cytometry and cytotoxicity assays***

For cell sorting,  $30 \times 10^6$  splenocytes/mL were stained with FITC-labeled anti-CD8a (53–6.7; BD Bioscience). Splenocytes were stained for 30 minutes at 4°C, washed, and sorted using a FACSAria apparatus. MHC I tetramers were provided by the NIH tetramer core facility (Atlanta, GA). For tetramer labeling, sorted CD8 T cells were stained with 2.5  $\mu\text{g}/10^6$  cells of the appropriate APC-labeled MHC class I tetramer for 15 minutes at 37°C prior to flow cytometry. Two negative controls were analyzed: (1) staining of naïve cells with the relevant tetramer, and (2) staining of primed cells with an irrelevant tetramer. Since both controls showed similar background staining, we present only staining of naïve cells with the relevant tetramer as a negative control. Analyses were performed on a BD Canto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Bioscience; Mississauga, ON, Canada). *In vitro* cytotoxicity assays were performed as previously described, with minor modifications<sup>28</sup>. Splenocytes harvested from immunized mice were depleted of natural killer cells using a biotinylated anti-NK1.1 antibody (Ab) (PK136; BD Bioscience) and the EasySep mouse biotin positive selection kit (Stem Cell Technologies). The remaining cells were restimulated *in vitro* in complete RPMI with 2  $\mu\text{M}$  of the relevant peptide for 5 days and used as effectors. Target cells were CFSE-stained EL4 cells. Effector and target cells were incubated at different ratios overnight and analyses were performed on a BD LSR II flow cytometer using FACSDiva. The percentage of specific lysis was calculated as follows:  $([\text{number of remaining CFSE}^+ \text{ cells after incubation of target cells alone} - \text{number of remaining CFSE}^+ \text{ cells after incubation with effector cells}] / \text{number of CFSE}^+ \text{ cells after incubation of target cells alone}) \times 100$ .

### ***MHC binding affinity and half-life pMHC complexes***

Generation of pMHC complexes is deficient in RMA-S cells because these cells do not express functional transporter associated with Ag processing. However, at reduced temperatures (26°C) RMA-S cells express empty, peptide-receptive, MHC class I molecules. These cells can, therefore, be used to load specific peptides on MHC molecules to create pMHC complexes that remain stable at 37°C<sup>29</sup>. For the evaluation of peptide binding to H2D<sup>b</sup> and H2K<sup>b</sup>, RMA-S cells

were incubated overnight at 26°C, pulsed with 10<sup>-10</sup> to 10<sup>-4</sup> M of the selected peptide, incubated at 37°C for 2 hours, washed, and stained with Abs against MHC I molecules. For assessment of MHC binding affinity, RMA-S cells were pulsed with the test peptide and 10<sup>-7</sup> M of FITC-conjugated competitor peptide. After incubation at 37°C for 1 hour, cells were washed and analyzed by flow cytometry to evaluate displacement of the FITC-conjugated peptide by the unlabeled peptide. To evaluate the half-life of pMHC complexes, RMA-S cells were incubated overnight at 26°C with 50 µM of the selected peptide. On the following morning, cells were washed, incubated at 37°C, stained for MHC I molecules, and analyzed by flow cytometry every hour for 12 hours. MHC staining was performed using Abs against H2Db (B22-249.R1; Cedarlane, Hornby, ON, Canada) or H2K<sup>b</sup> (Y3; ATCC, Manassas, VA). Cell aliquots were stained with biotin-labeled anti-IgG2a-k, (8.3; BD Bioscience) and PE-conjugated streptavidin (BD Bioscience) for H2D<sup>b</sup>, and with FITC-conjugated anti-IgG2b-k (R12-3; BD Bioscience) for H2K<sup>b</sup>. Half-life of pMHC complexes and affinity of peptides for MHC I molecules were estimated using a 1-phase exponential decay equation and a dose-response curve, respectively<sup>30,31</sup>.

### ***Elispot and avidity assays***

Millipore MultiScreen PVDF plates were permeabilized with 35% ethanol, washed, and coated overnight using the Mouse IFN-γ ELISpot Ready-SET-Go! reagent set from e-Bioscience (San Diego, CA). After 16 hours, sorted CD8 T cells from immunized and nonimmunized mice were plated and incubated at 37°C for 48 hours in the presence of irradiated splenocytes from syngeneic mice pulsed with the relevant peptide (4 µM for the ELISpot assay and 10<sup>-4</sup> to 10<sup>-14</sup> M for the avidity assay). As a negative control, CD8 T cells from naïve mice were incubated with peptide-pulsed splenocytes. Spots were revealed using the reagent set manufacturer protocol and were enumerated using an ImmunoSpot S5 UV Analyzer (Cellular Technology Ltd, Shaker Heights, OH). IFN-γ production was expressed as the number of spot-forming cells per 10<sup>6</sup> cells and the EC<sub>50</sub> was calculated using a dose-response curve.

### ***Peptide quantification***

MHC I-associated peptides were eluted from the cell surface of 500 × 10<sup>6</sup> EL4 cells by mild acid elution as previously described<sup>32</sup>. Eluates were spiked with 500 fmoles of each 13C-

labeled synthetic peptide, desalted on an HLB cartridge 30 cc, filtered with a 3000 Da cut-off membrane and separated into 7 fractions by strong cation exchange SpinTips (Protea Bioscience). Fractions were resuspended in .2% formic acid and analyzed by LC-MS/MS using an Eksigent LC system coupled to an LTQ-Orbitrap ELITE mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated on a custom C18 reversed phase column (150  $\mu$ m i.d. X 100 mm, Jupiter Proteo 4  $\mu$ m, Phenomenex) using a flow rate of 600 nL/minute and a linear gradient of 3% to 60% aqueous ACN (.2% formic acid) in 120 minutes. Full mass spectra were acquired with the Orbitrap analyzer operated at a resolving power of 30,000 (at m/z 400). Mass calibration used an internal lock mass (protonated (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>; m/z 445.120029) and mass accuracy of peptide measurements was within 5 parts per million. MS/MS spectra were acquired at higher energy collisional dissociation with a normalized collision energy of 35%. Up to 12 precursor ions were accumulated to a target value of 50,000 with a maximum injection time of 300 ms and fragment ions were transferred to the Orbitrap analyzer operating at a resolution of 15,000 at m/z 400. The peptide quantification protocol was adapted from Anthony W. Purcell et al.<sup>33</sup>. Briefly, Excalibur software (Thermo Science) was used to extract both light (endogenous) and heavy forms (<sup>13</sup>C-labeled) of peptides ion mass chromatogram from mass spectrometry raw files generated from different samples. Absolute quantification was calculated using the following formula: ([Light area under peak/Heavy area under peak]  $\times$  [500 fmoles of <sup>13</sup>C-labeled synthetic peptides  $\times$  Avogadro's number]) / cell number.

### ***Statistical Analysis***

Results are expressed as means  $\pm$  SD. Statistical significance was tested using parametric and nonparametric tests. P values  $<$  .05 were considered statistically significant.

## 3.7 Results

### 3.7.1 Experimental model

We used the EL4 T-lymphoblastic leukemia cell line that originated from a C57BL/6 (B6) mouse. Amino acid sequences of several B6 MiHAs were elucidated by us and others, including H3<sup>a</sup>, H4<sup>a</sup>, H7<sup>a</sup> and H13<sup>a</sup>, which were used in this study<sup>34-39</sup>. In addition, we studied 4 LAAs, which were shown by mass spectrometry (MS) analyses to be present on EL4 cells but not on B6 thymocytes: VAAANREVL (Xlr3), SMYVPGKL (Pfdn5), STLTYSRM (Sgk) and NSMVLFDHV (Top2a) (**Table 3.1**)<sup>32</sup>. Genes coding for these LAAs were shown to be involved in several types of cancer (**Supplemental Table 3.1**).

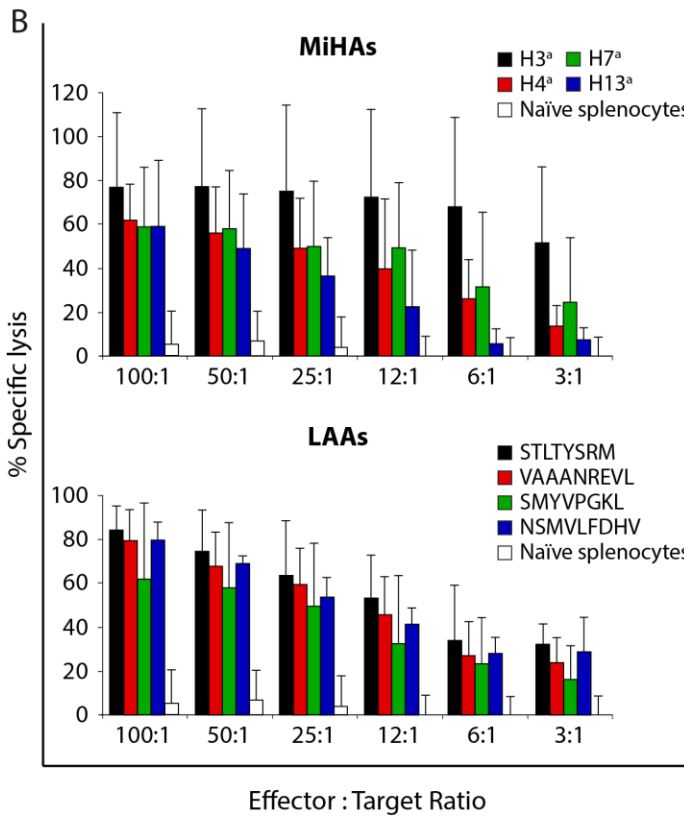
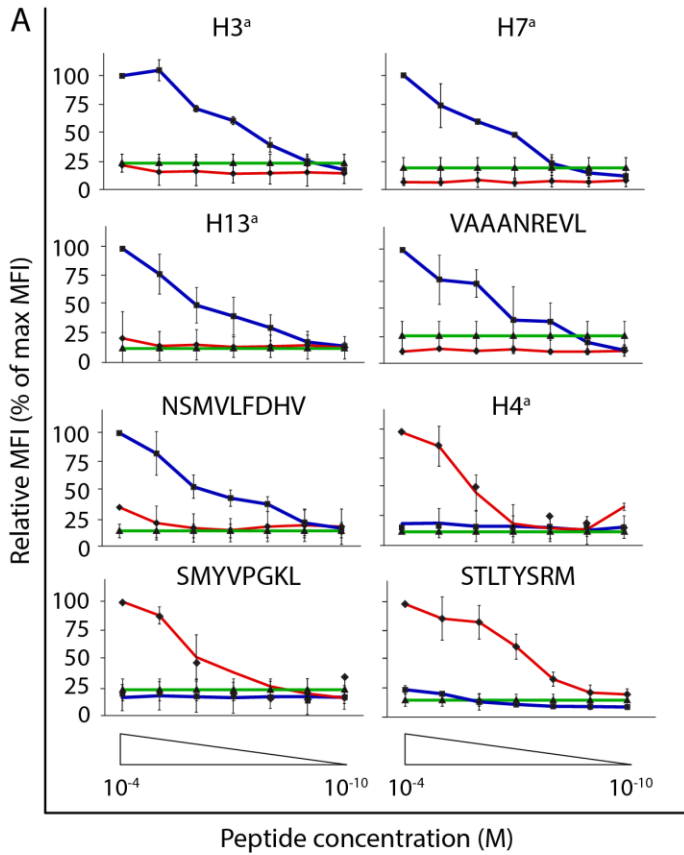
**Table 3.1. Key features of MiHAs and LAAs**

Antigen Type	Peptide Sequence	Peptide Source Gene	MHC I Allele	Predicted Binding Score (Nm)*	Reference
miHAs	ASPCNSTVL (H3 <sup>a</sup> )	Zfp106	H2D <sup>b</sup>	5.53	[34]
	TSPRNSTVL (H3 <sup>b</sup> )				
	SGTVYIHL (H4 <sup>a</sup> )	Emp3	H2K <sup>b</sup>	60.06	[35]
	SGIVYIHL (H4 <sup>b</sup> )				
	KAPDNRETL (H7 <sup>a</sup> )	Stt3b	H2D <sup>b</sup>	37.51	[36,37]
	KAPDNRTL (H7 <sup>b</sup> )				
LAAs	SSVVGWYWL (H13 <sup>a</sup> )	H13	H2D <sup>b</sup>	73.76	[38,39]
	SSVIGWYWL (H13 <sup>b</sup> )				
	NSMVLFDHV	Top2a	H2D <sup>b</sup>	466.68	[32]
	VAAANREVL	Xlr3a	H2D <sup>b</sup>	16.48	[32]
	SMYVPGKL	Pfdn5	H2K <sup>b</sup>	146.63	[32]
	STLTYSRM	Sgk1	H2K <sup>b</sup>	12.44	[32]

miHA indicates minor histocompatibility antigens; LAAs, leukemia-associated antigens.

\* Predicted MHC binding score was determined using NetMHCCons.

We experimentally validated that (1) each of our Ags was presented by either H2D<sup>b</sup> or H2K<sup>b</sup> (**Figure 3.1a**); and (2) in each case, mice primed with Ag-pulsed DCs generated cytotoxic T cells that killed EL4 cells *in vitro* (**Figure 3.1b**). Thus, our 8 Ags were immunogenic and were presented at the surface of EL4 cells by a single MHC class I allotype.

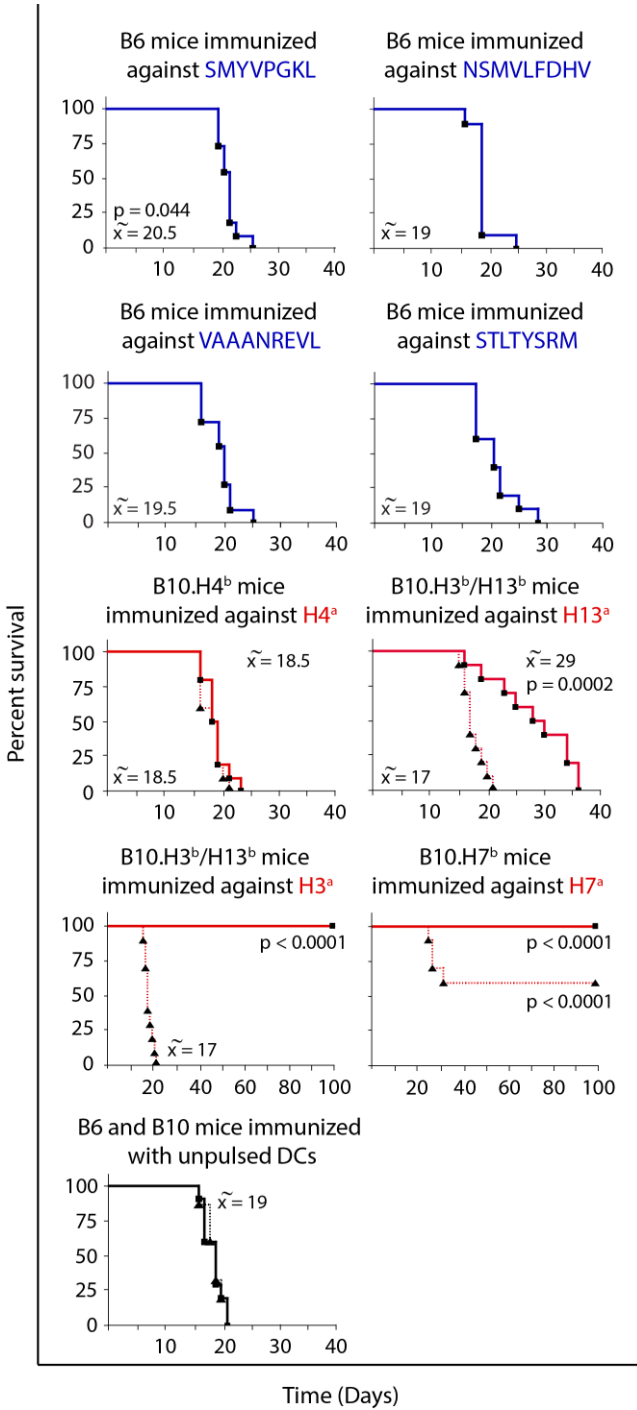


**Figure 3.1. LAAs and MiHAs are immunogenic and bind to a single MHC class I allotype.** (A) Binding of LAAs and MiHAs to H2D<sup>b</sup> and H2K<sup>b</sup>. RMA-S cells were pulsed with graded concentrations of the relevant peptide and stained with Ab against H2D<sup>b</sup> (blue) or H2K<sup>b</sup> (red). As a negative control (green), unpulsed RMA-S cells were stained with Ab recognizing the relevant H2 allotype (H2D<sup>b</sup> or H2K<sup>b</sup>). The relative binding (y axis) was calculated by normalizing the MFI obtained with each peptide concentration (x axis) to the intensity obtained at a peptide concentration of  $10^{-4}$  M. (B) Cytotoxic T lymphocytes primed against individual MiHAs and LAAs kill EL4 cells *in vitro*. Mice were immunized twice (day -14 and -7) with peptide-pulsed DCs. We used B6 mice for LAAs and B10-congenetic mice expressing the MiHAs *b* allele for the MiHAs. On day 0, splenocytes from naïve and from immunized mice were depleted of NK cells and restimulated *in vitro* with peptide (2  $\mu$ M) for 5 days. The resulting effector cells were incubated at different effector: target ratios with CFSE-stained EL4 target cells (x axis). All data are representative of 3 independent replicates.

### 3.7.2 Protective antileukemic responses can be generated by some MiHAs but none of the LAAs

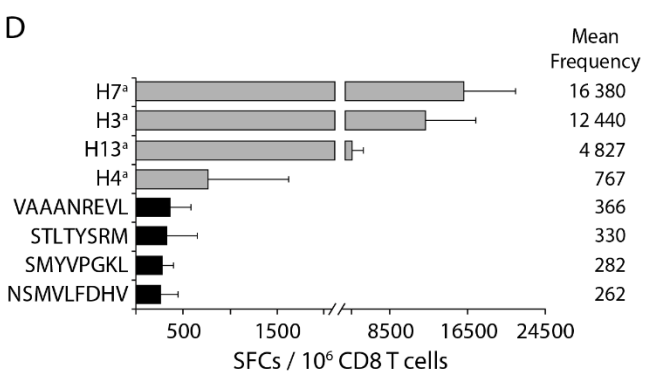
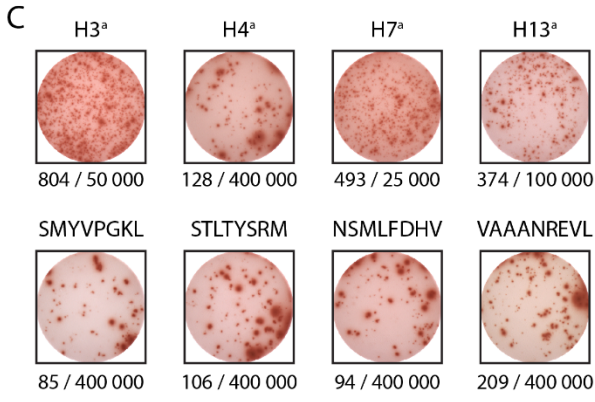
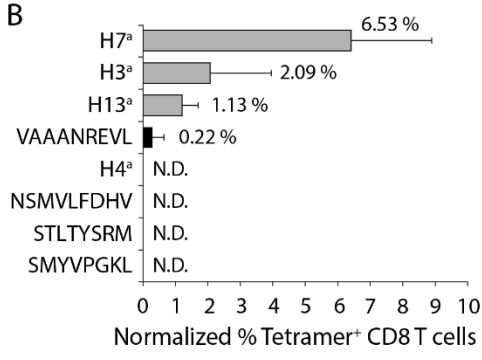
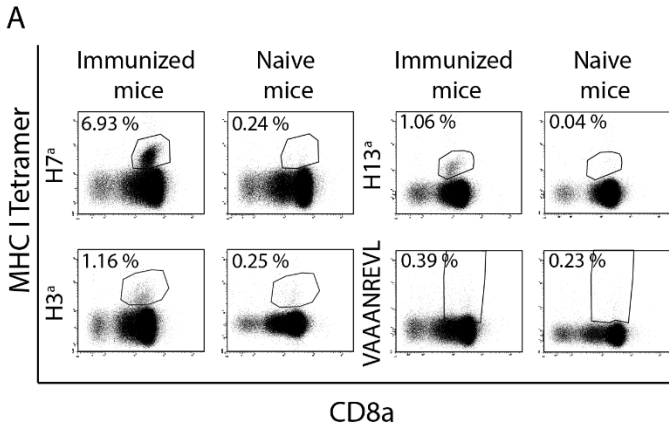
First, we wished to evaluate whether immunization against individual Ags could protect mice against EL4 leukemia. Mice were primed twice (day -14 and -7) with DCs pulsed with the MiHAs or LAA of interest. On day 0, mice were injected with  $5 \times 10^5$  EL4 cells, and were, thereafter, monitored daily. Mice that were paralyzed, moribund, or presented tumors with a diameter greater than 1 cm were euthanized. B10-congenetic mice were primed against MiHAs and B6 mice were primed against LAAs. We previously reported that disparity at the H9 locus between B10 and B6 mice had no effect on their respective response to EL4 cell injection<sup>40,41</sup>. Control mice were immunized with unpulsed syngeneic DCs.

Immunization against the H4<sup>a</sup> MiHAs and the 4 LAAs had no biologically significant effect on mice survival: all mice had to be sacrificed by day 29. For H4<sup>a</sup> and 3 LAAs, median survival was similar to that of control animals immunized with unpulsed DCs; for the SMYVPGKL LAA, immunization barely increased survival by 1.5 day (**Figure 3.2**). In contrast, priming against 3 other MiHAs increased the mean survival to 29 days for H13<sup>a</sup> and to more than 100 days for H3<sup>a</sup> or H7<sup>a</sup>. The protective value of anti-H7<sup>a</sup> responses was particularly impressive, as no death occurred before day 26 in unprimed B10.H7b mice and 60% remained leukemia-free at day 100 (**Figure 3.2**). To further hierarchize our Ags, we injected  $5 \times 10^4$  EL4 cells (10-fold less than in the previous experiment) into mice immunized against the 6 Ags that did not generate complete protection against  $5 \times 10^5$  EL4 cells. Immunization against the 4 individual LAAs and H4<sup>a</sup> had no or only marginal effect on mice survival (**Supplemental Figure 3.1**). By contrast, 40% of mice immunized against H13<sup>a</sup> remained leukemia-free on day 100 (**Supplemental Figure 3.1**). These data reveal the following hierarchy in the potency of antileukemic responses elicited by our 8 Ags: H7<sup>a</sup> > H3<sup>a</sup> > H13<sup>a</sup> > the 4 LAAs and H4<sup>a</sup>. Accordingly, protective antileukemic responses were induced by 3 out of 4 MiHAs but none of the LAAs.



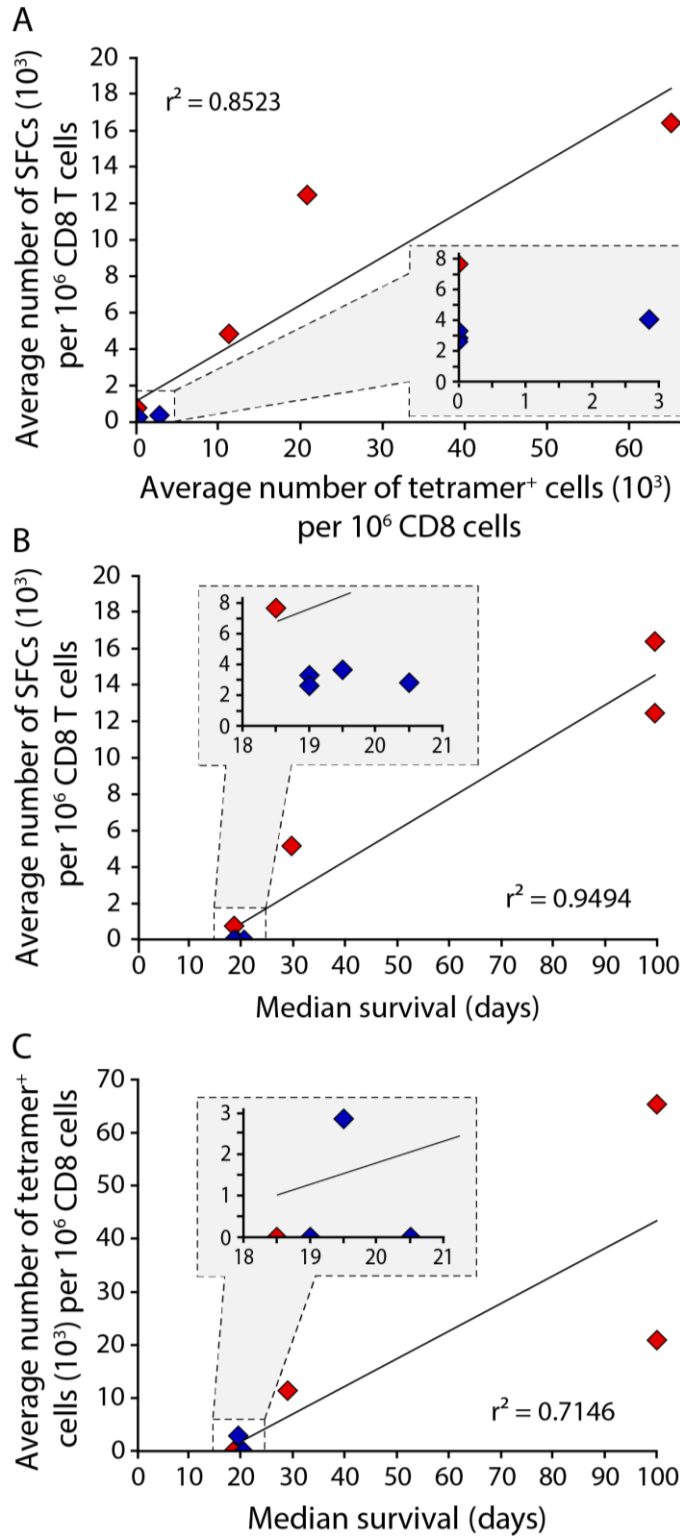
**Figure 3.2. Mice immunized against MiHAs are more resistant to EL4 cells than mice immunized against LAAs.** B6 (solid blue line) or B10-congenic (solid red line) mice were immunized with peptide-pulsed DCs on day -14 and -7, and received  $5 \times 10^5$  EL4 cells i.v. on day 0. In control groups, EL4 cells were injected into B6 (solid black line), B10 (black dotted line) and B10-congenic (red dotted line) mice immunized with unpulsed DCs.  $\tilde{X}$  represents the median survival time. The log-rank test was used to compare the survival of various groups to that of B6 or B10 mice immunized with unpulsed DCs. Ten to 15 mice per group.





CD8 T cells plated (3 independent experiments).

**Figure 3.3. Frequency of Ag-specific CD8 T cells in primed mice.** B6 or B10-congenetic mice were immunized twice with peptide-pulsed DCs (day -14 and -7). On day 0, splenocytes were harvested from the spleen of 3 naïve and 3 immunized mice (B6 mice for LAAs and B10-congenetic mice expressing the b allele for the MiHAs). Splenocytes were stained with anti-CD8a Ab and sorted by fluorescence-activated cell sorting. (A and B) Sorted CD8 T cells were stained with MHC class I tetramers. (A) One representative experiment. (B) Frequency of tetramer<sup>+</sup> elements among CD8 T cells. Specific tetramer staining was obtained by subtracting the unspecific staining observed in naïve unprimed mice. N.D. indicates not detected. Data represent the mean percentage of tetramer<sup>+</sup> cells. Four to 5 independent experiments per Ag. The frequencies of tetramer<sup>+</sup> T cells was significantly higher for H7<sup>a</sup>, H3<sup>a</sup>, and H13<sup>a</sup> than for other Ags ( $P < .05$ ; t-test). (C and D) Sorted CD8 T cells were plated on a MultiScreen PVDF plate and incubated for 48 hours in the presence of irradiated peptide-pulsed splenocytes. SFCs were counted using an ImmunoSpot analyzer. (C) One representative experiment. The number of spot forming cells and the number of plated CD8 T cells are indicated below each well. (D) The frequency of SFCs in primed mice was calculated by subtracting the number of SFCs in naïve mice. Data are expressed as the mean frequency of SFCs per  $10^6$



**Figure 3.4. The frequency of Ag-specific CD8 T cells in immunized mice correlates with survival.** (A) Correlation between the frequencies of SFCs (IFN- $\gamma$  ELISpot) and of tetramer<sup>+</sup> T cells. Correlation between median survival and (B) the frequencies of SFCs (IFN- $\gamma$  ELISpot) and of (C) tetramer<sup>+</sup> T cells. Fitness of curves was determined by the coefficient of determination ( $r^2$ ). MiHAs are represented in red, LAAs in blue. Grey inserts show zoomed in depiction of low values.

### 3.7.3 Frequency of MiHA- and LAA-specific CD8 T cells in immunized mice

Next, we assessed T cell expansion after Ag priming using 2 methods: tetramer staining and IFN- $\gamma$  ELISpot. These analyses were performed on FACS-sorted CD8 T cells from naïve and immunized mice. Mice immunized against H7<sup>a</sup>, H3<sup>a</sup> and H13<sup>a</sup> showed conspicuous accumulation of tetramer-positive CD8 T cells (**Figure 3.3a, b**). For H4<sup>a</sup> and 3 LAAs, no tetramer<sup>+</sup> cells were detected, while in the case of VAAANREVL, a few tetramer<sup>+</sup> cells were observed.

In IFN- $\gamma$  ELISpot assays, the mean frequency of SFCs per 10<sup>6</sup> CD8 T cells was 16,380 for H7<sup>a</sup>, 12,440 for H3<sup>a</sup> and 4,827 for H13<sup>a</sup> (**Figure 3.3c, d**). For H4<sup>a</sup> and the 4 LAAs, the frequency of SFCs was less than 1,000 per 10<sup>6</sup> CD8 T cells. Thus, the Ag hierarchy in ELISpot assays was consistent with the hierarchy observed using tetramer staining (**Figure 3.4A**). Furthermore, the frequency of Ag-specific T cells detected with tetramer staining and IFN- $\gamma$  ELISpot showed a strong correlation with mice survival after injection of EL4 cells (**Figure 3.4b, c**). The salient finding is, therefore, that the amplitude of T cell expansion correlates with the strength of antileukemic responses. Of note, for the 3 most immunogenic Ags (H7<sup>a</sup>, H3<sup>a</sup>, and H13<sup>a</sup>), the number of cells labeled by tetramers (11,337 to 65,295 per 10<sup>6</sup> CD8 T cells) was about 3-fold greater than the number of IFN- $\gamma$  producing cells (4827 to 16,380 per 10<sup>6</sup> CD8 T cells). In contrast, with the other Ags, the frequency of SFCs was similar (VAAANREVL) or greater (H4<sup>a</sup> and 3 LAAs) than the frequency tetramer<sup>+</sup> cells (**Figures 3.3, 3.4**). Tetramer staining can detect T cells with medium- to high-affinity TCRs. CD8 T cells with low-affinity TCRs are not stained by pMHC tetramers but can be detected with functional assays such as the IFN- $\gamma$  ELISpot<sup>42-44</sup>. Our data, therefore, suggest that TCRs recognizing H7<sup>a</sup>, H3<sup>a</sup>, and H13<sup>a</sup> had higher affinity for pMHC than TCRs recognizing other Ags.

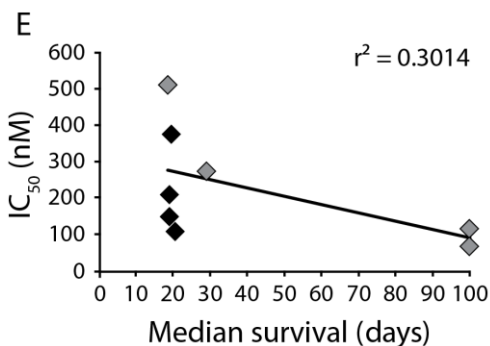
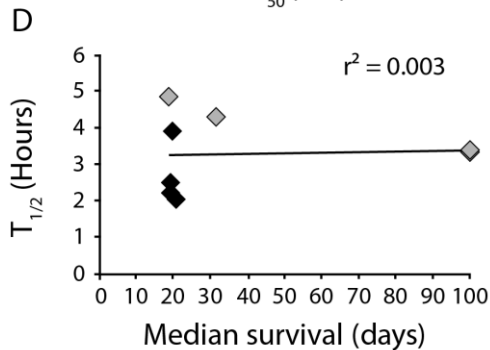
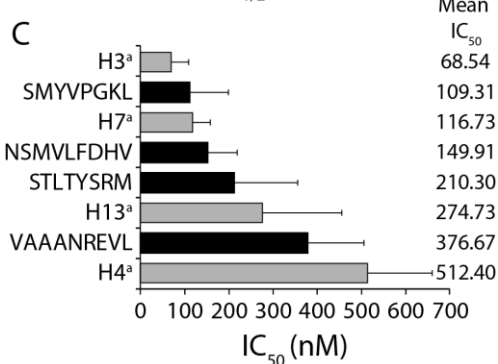
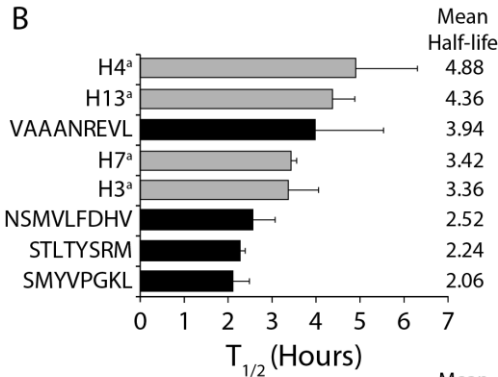
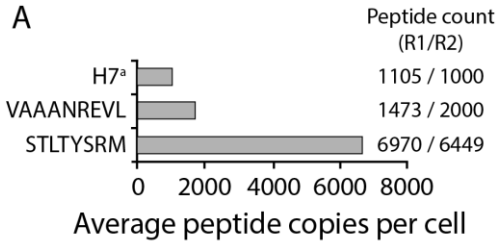
### 3.7.4 Antileukemic activity correlates with T cell functional avidity

Having identified 3 immunodominant Ags that were able to induce protective antileukemic responses, we sought to determine the mechanism responsible for their dominance. As pointed out by Bihl et al., the term immunodominance is as widely used as it is loosely defined<sup>45</sup>. This is largely because the immunodominance hierarchy may vary as a function of

the criteria used to build the hierarchy<sup>46</sup>. Here, we established our Ag hierarchy as a function of their ability to generate protective antileukemic responses (**Figure 3.1, Supplemental Figure 3.1**):  $H7^a > H3^a > H13^a >$  the 4 LAAs and  $H4^a$ . This hierarchy was congruent with the number of Ag-specific T cells found after immunization (**Figure 3.3**). We then analyzed the factors associated with immunodominance in various experimental models, including properties of the Ag (density on target cells, MHC binding affinity, and stability of pMHC complexes) and of cognate T cells (frequency and functional avidity)<sup>31,47-59</sup>.

#### 3.7.4.1 Epitope density on EL4 cells

MHC I-associated peptides were eluted from the cell surface of EL4 cells, spiked with <sup>13</sup>C-labeled synthetic peptides, fractionated by liquid chromatography and analyzed by MS for detection of isotopomers. Isotopomers (peptides that have the same sequence but differ by the presence of 1 isotopically labelled atom), appear as co-eluting pairs with a defined mass difference<sup>28,60</sup>. Absolute quantification of peptide abundance was achieved by comparing the abundance of native peptides to their corresponding <sup>13</sup>C-synthetic analogs. Three peptides were selected for analysis:  $H7^a$  which stands at the top of the hierarchy, and 2 LAAs, which are at the bottom of the hierarchy (VAAANREVL and STLTYSRM). Of note, based on the NetMHCCons algorithm<sup>61</sup>, these 3 peptides were predicted to have high MHC binding scores (**Table 3.1**). The mean number of peptide copies per EL4 cell was estimated to be 1053 for  $H7^a$ , 1737 for VAAANREVL and 6710 for STLTYSRM (**Figure 3.5a**). Thus, the abundance of  $H7^a$  was in no way remarkable, being lower than that of the 2 LAAs. Hence, epitope abundance on target EL4 cells did not correlate with immunodominance.



**Figure 3.5. Epitope stability and abundance on EL4 cells do not correlate with Ag potency.** (A) Peptide abundance at the surface of EL4 cells. The abundance of H7<sup>a</sup>, VAAANREVL, and STLTYSRM was measured by MS. Two biological replicates (R1 and R2) per peptide. (B) Half-life of pMHC complexes. RMA-S cells were incubated overnight with 50  $\mu$ M of the selected peptide. Cells were then washed, incubated at 37°C and chased every hour for 12 hours by staining for either H2D<sup>b</sup> or H2K<sup>b</sup>. The half-life of the top 5 Ags was longer than that of STLTYSRM and SMYVPGKL ( $P < .05$ ; t-test). (C) Peptide binding affinity was determined by a competition-based peptide-binding assay. RMA-S cells were pulsed with peptide concentrations ranging from  $10^{-10}$  to  $10^{-4}$  M and with  $10^{-7}$  M of (ASP[Lys-FITC]NSTVL) (H3a) for H2Db binding peptides or (SII[Lys-FITC]FEKL) for H2Kb binding peptides. Data were normalized to maximum intensity values. The top 4 Ags showed a greater MHC binding affinity than VAAANREVL and H4a ( $P < .05$ ; t-test). However, statistical analysis showed no significant differences between MiHAs (grey) and LAAs (black). Half-life of pMHC complexes (D) and peptide binding affinity (E) were plotted against the median survival of EL4 bearing mice. Fitness of the curves was determined by the coefficient of determination ( $r^2$ ).

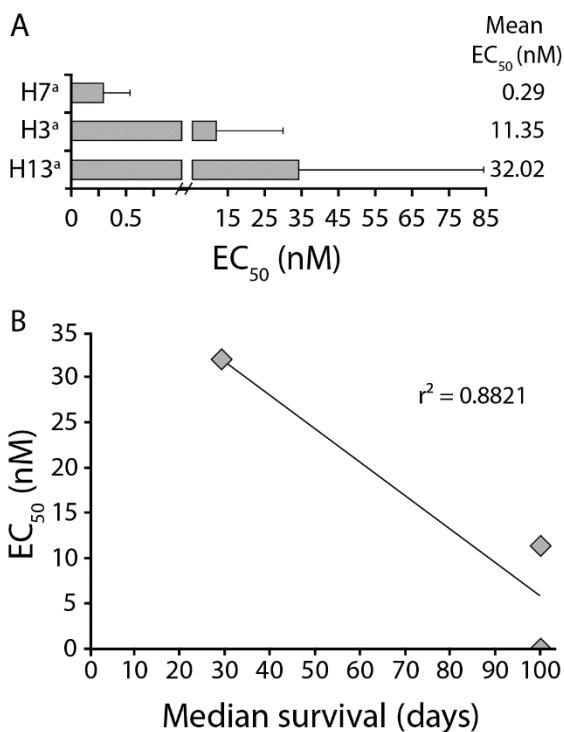
### 3.7.4.2 MHC binding affinity and stability of pMHC complexes

For the assessment of the half-life of pMHC complexes, RMA-S cells were incubated at 26°C overnight with the selected peptide. Cells were then washed, incubated at 37°C, and analyzed by flow cytometry every hour for 12 hours for expression of H2D<sup>b</sup> or H2K<sup>b</sup>. The half-life of pMHC complexes, determined by using a 1-phase exponential decay equation, ranged from 2.06 hours to 4.88 hours (**Figure 3.5b**). To evaluate the MHC binding affinity of our 8 peptides, we performed a competition-based assay using FITC-labeled synthetic peptides<sup>30</sup>. We compared the ability of H2D<sup>b</sup> and H2K<sup>b</sup> binding peptides to displace either (ASP[Lys-FITC]NSTVL) (H3<sup>a</sup>) or (SII[Lys-FITC]FEKL), respectively. We validated that FITC-conjugation of the reference peptides did not prevent binding to their respective MHC allotype (data not shown). The peptide concentration required for half-maximal displacement of the FITC-conjugated peptide was determined using a dose-response curve and ranged from 68.54 to 512.40 nM for (**Figure 3.5c**). The MHC binding affinity and stability of pMHC complexes did not correlate with the strength of antileukemic responses (**Figure 3.5d, e**). For both parameters we observed a major overlap between immunodominant and immunorecessive epitopes (**Figure 3.5b, c**).

### 3.7.4.3 T cell functional avidity

If immunodominance in our model is not dictated by properties of the Ags per se, it must be dictated by properties of their cognate T cells: T cell frequency in the preimmune repertoire or T cell functional avidity<sup>57,58,62</sup>. Frequencies of Ag-specific T cells in the preimmune repertoire range from 1 to 89 cells/million naïve CD8 T cells<sup>57</sup>. That the frequency of H7<sup>a</sup>-specific T cells lies at the lower end of this range (at 2 cells/million)<sup>31</sup> argues against the possibility that our immunodominant Ags are recognized by high-frequency CD8 T cells. We, therefore, investigated the role of functional avidity of Ag-specific T cells using serial peptide concentrations and defining EC<sub>50</sub> as the exogenous peptide concentration yielding half-maximal counts in IFN- $\gamma$  ELISpot assays. In these assays, functional avidity (or antigen sensitivity) of CD8 T cells refers to their activation threshold in response to defined concentrations of exogenous peptide<sup>54,63</sup>. We were unable to assess the frequency of T cells specific for H4<sup>a</sup> and the 4 LAAs because their frequency was too low (**Figure 3.3d**). Nonetheless, we found that the

EC<sub>50</sub> for H7<sup>a</sup>, H3<sup>a</sup>, and H13<sup>a</sup> (the 3 top Ags) were .28 nM, 11.35 nM and 32.02 nM, respectively (Figure 3.6a). Functional avidity showed a strong correlation with antileukemic activity (Figure 3.6b).



**Figure 3.6. T cell functional avidity correlates with Ag potency.** Sorted CD8 T cells were plated on a MultiScreen PVDF plate and incubated for 48 hours in the presence of peptide-pulsed ( $10^{-4}$  to  $10^{-14}$  M) irradiated splenocytes. SFCs were counted using an ImmunoSpot analyzer. (A) Data were normalized to maximum intensity value and plotted using dose-response curves to determine the EC<sub>50</sub> of each peptide (3 independent experiments). The functional avidity of H7<sup>a</sup>-specific T cells was superior to that of H3<sup>a</sup> and H13<sup>a</sup>-specific T cells ( $P < .05$ ) (B) Average avidity was plotted against the median survival following injection of EL4 cells. Fitness of curves was determined by the coefficient of determination ( $r^2$ ).

### 3.8 Discussion

Our work provides a direct comparison of antileukemic responses elicited by individual MiHAs and LAAs. We wish to reiterate that the 8 Ags studied herein were shown to be present on EL4 cells<sup>32,34-39</sup> and each of them elicited CD8 T cells responses detectable by ELISpot and cytotoxicity assays. Furthermore, for priming mice against specific Ags before challenge with EL4 cells, we used DCs pulsed with the same peptide concentration (2  $\mu$ M) in each case. Thus, we strived to minimize any potential bias toward MiHAs or LAAs and, a priori, our 8 Ags might have been considered potential targets for leukemia immunotherapy. This was definitely not the case, and we posit that several points can be made from our study.

One clear conclusion is that the mere expression of a given Ag on the surface of leukemic cell and its ability to elicit IFN- $\gamma$  secretion and cytotoxic responses (*in vitro*) are insufficient to predict that the Ag will elicit expansion of tetramer<sup>+</sup> T cells and biologically relevant T cell responses *in vivo*. That was the case for our 4 LAAs and 1 MiHAs (H4<sup>a</sup>). *In vitro* ELISpot and cytotoxicity assays are very sensitive and may pick up biologically irrelevant responses from tetramer-negative T cells<sup>59,64</sup>. Indeed, CD8 T cells that respond specifically to pMHC on target cells (*in vitro*), yet are not stained by the same pMHC as tetramers, have been reported in several studies<sup>42,65-67</sup>. These *in vitro* responsive but tetramer-negative CD8 T cells were shown to display low TCR-pMHC affinity and, therefore, to be functionally inferior to tetramer<sup>+</sup> T cells *in vivo*<sup>43,59</sup>. Other negative findings relate to pMHC interactions: MiHAs and LAAs had overlapping affinities for their cognate MHC molecule, and neither peptide affinity nor the stability of pMHC complexes correlated with the strength of T cell responses. Because absolute peptide quantification by MS is not widely available, very little is known on the expression of MiHAs and LAAs at the peptide level (as opposed to the transcript or protein level)<sup>68</sup>.

Somewhat unexpectedly, we found that peptide density on leukemic cells did not correlate with the ability of primed T cells to eliminate leukemic cells. The abundance of H7<sup>a</sup> (the best Ag) was inferior to that of the 2 LAAs, which elicited no antileukemic response (**Figure 3.5a**). Thus, at the effector stage, epitope density on target cells was not a critical parameter. This is consistent with the fact that killing of target cells by effector CD8 T cells only requires 3 pMHC complexes/target cell, and that the delivery of lytic granules to target cells is rapid and insensitive to Ag density<sup>59,69,70</sup>.



In our model, LAAs were clearly inferior to MiHAs as targets for immunotherapy. The most parsimonious explanation is that high avidity T cells are deleted from the T cell repertoire specific for self Ags (LAAs) but not for allo-Ags (MiHAs). However, it would be premature to dismiss all LAAs from future studies. There are 3 main classes of LAAs: those that are overexpressed on leukemic relative to normal cells, cancer-testis Ags, and leukemia-specific Ags derived from cancer-specific somatic mutations. Our conclusions strictly concern LAAs that are overexpressed on leukemic cells relative to normal cells. Overexpressed Ags nonetheless represent the largest class of LAAs (eg, WT1, PR1, hTERT) and the class that has received most attention because these Ags are present on leukemic cells in most patients<sup>1</sup>. Cancer-testis Ags are attractive because they are shared by many tumors and were thought to be expressed only in tissues that do not express MHC molecules and cannot, therefore, induce central tolerance. However, more refined studies have revealed expression of cancer-testis Ags in several cell subsets, including medullary thymic epithelial cells<sup>71,72</sup>. Furthermore, with 1 exception (cyclin-A1), cancer-testis Ags are poorly expressed by leukemic cells<sup>73</sup>. From an immunologic perspective, Ags derived from cancer mutations are extremely attractive because they are truly cancer specific and cannot induce canonical central tolerance. However, 2 recent reports suggest that discovery of immunogenic leukemia-specific Ags will be extremely challenging and might be impossible for a large proportion of patients. Indeed, hematologic cancers have fewer mutations than other cancers (eg, an average of 13 mutations per acute myelogenous leukemia genome)<sup>24</sup>, and only about 5% of cancer mutations yield immunogenic HLA class I-associated epitopes<sup>74</sup>.

The number of potential antigenic targets (MiHAs and LAAs) for T cell based leukemia immunotherapy is considerable. It would be impossible to evaluate *in vivo* the antileukemic potency of T cells targeted to all potential Ags. It is therefore imperative to establish reliable criteria for *in vitro* prediction of antileukemic activity. Of practical importance, we found that the best predictor of antileukemic efficacy measurable directly *in vitro* was T cell functional avidity. Functional avidity is determined mainly by TCR affinity for its cognate epitope: in some models the  $k_{on}$  of TCR-pMHC association is the key element, in others the  $k_{off}$  is more important<sup>31,58,75</sup>. Other factors may impinge on functional avidity including the expression level of TCRs, adhesion molecules or coreceptors, and changes in components of the signaling

cascade. When dealing with polyclonal T cell populations (as opposed to single TCRs), it is difficult to decipher the underpinnings of differential functional avidity. Nonetheless, from a practical standpoint, our work suggests that *in vitro* evaluation of functional avidity represents the best criterion for selection of Ags, which should be prioritized in clinical trials of leukemia immunotherapy.

### **3.9 Acknowledgments and disclosure**

We are grateful to the staff of the animal care, flow cytometry and proteomics IRIC core facilities for their assistance. The authors also thank the NIH tetramer core facility for providing reagents as well as Danielle de Verteuil, Moutih Rafei and Sébastien Lemieux for thoughtful comments.

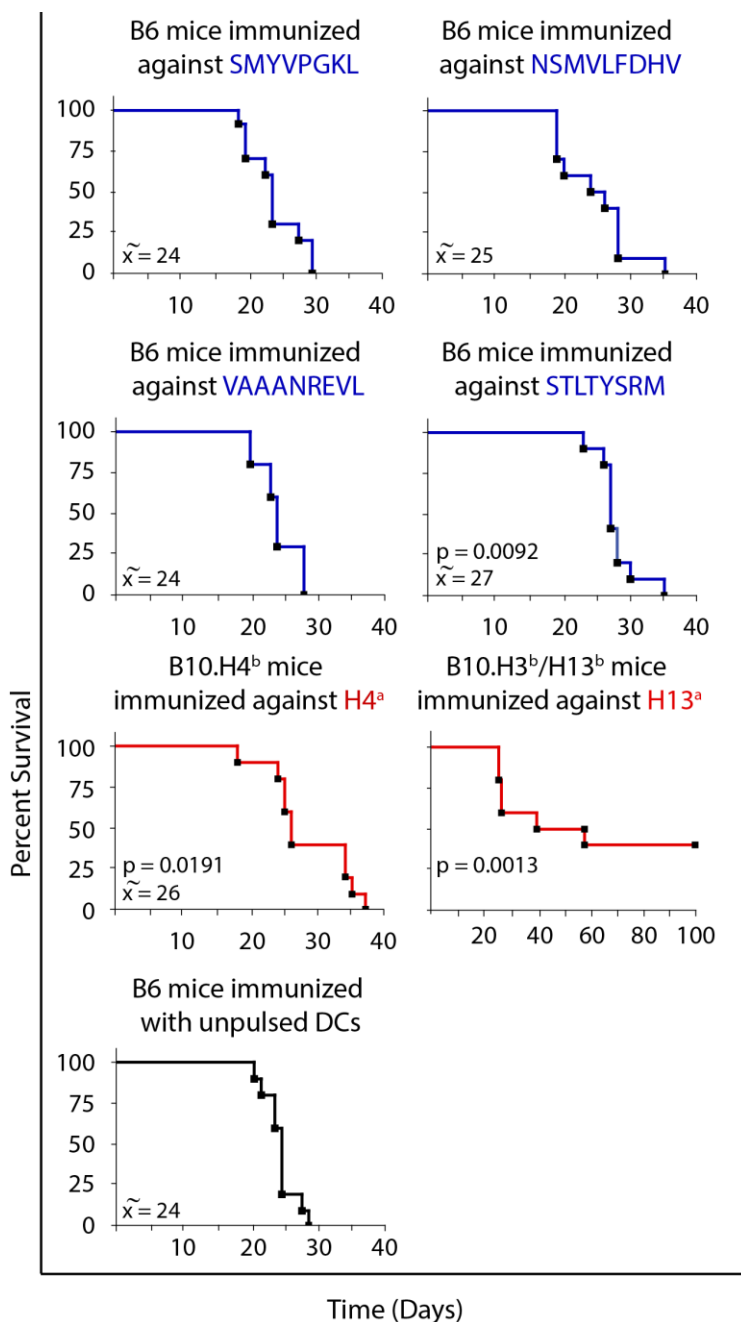
*Financial disclosure:* The Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) is supported in part by the Canada Foundation for Innovation and the Fonds de Recherche Santé Québec. K.V. holds a PhD studentship from the Canadian Institutes of Health Research, I.S.F. is a recipient of a PhD scholarship from le Fonds de la Recherche du Québec-Santé, and C.M.L. was supported by a studentship from the Défi Persévérance-Famille Gosselin Fund. C.P. and P.T. hold Canada Research Chairs in Immunobiology, and Proteomics and Bioanalytical Spectrometry, respectively. H.S. is supported by the Leukemia and Lymphoma Society of Canada and by La Fondation Centre de Cancérologie Charles-Bruneau. C.P.'s lab is supported in part by the Katelyn Bedard Bone Marrow Association. This study was funded by the Leukemia & Lymphoma Society of Canada.

*Conflict of interest statement:* There are no conflicts of interest to report.

## 3.10 Supplementary table and figure

Supplementary table 3.1. Features of LAA-coding genes

Peptide source protein	Cancer association	Reference
SGK1	Tumorigenesis	Feng Z, Liu L, Zhang C, et al. Chronic restraint stress attenuates p53 function and promotes tumorigenesis. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 2012;109(18):7013–7018.
	Breast tumor	McClintock MK, Conzen SD, et al. Mammary cancer and social interactions: identifying multiple environments that regulate gene expression throughout the life span. <i>J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.</i> 2005;60 (Special Issue 1):32–41.
	Glioblastoma, Renal carcinoma	Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. <i>Nat Genet.</i> 2000;24(3):227–235.
PFDNS	Alternative splicing in tumors	Guimarães GS, Latini FRM, Camacho CP, et al. Identification of candidates for tumor-specific alternative splicing in the thyroid. <i>Genes Chromosomes Canc.</i> 2006;45(6):540–553.
	Non-small lung cancer	Tian T, Hao J, Xu A, et al. Determination of metastasis-associated proteins in non-small cell lung cancer by comparative proteomic analysis. <i>Cancer Science.</i> 2007;98(8):1265–1274.
	Hepatocellular carcinoma	Bureau C, Péron J, Bouisson M, et al. Expression of the transcription factor Klf6 in cirrhosis, macronodules, and hepatocellular carcinoma. <i>Journal of Gastroen and Hepatol.</i> 2008;23(1):78–86.
TOP2A	Melanoma	Song L, Robson T, Doig T, et al. DNA repair and replication proteins as prognostic markers in melanoma. <i>Histopathology.</i> 2013;62(2):343–350.
	Breast adenocarcinoma	Bubnov V, Moskalev E, Petrovskiy Y, et al. Hypermethylation of TUSC5 genes in breast cancer tissue. <i>Exp. Oncol.</i> 2012;34(4):370–372.
	Thymoma, Thymic carcinoma	Monica V, Familiari U, Chiusa L, et al. Messenger RNA and protein expression of thymidylate synthase and DNA repair genes in thymic tumors. <i>Lung Cancer.</i> 2013;79(3):228–235.
	Prostate cancer	Kuner R, Fälth M, Pressinotti NC, et al. The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high-grade prostate cancer. <i>J. Mol. Med.</i> 2013;91(2):237–248.
XLR3A	Lymphoid malignancies	Siegel JN, Turner CA, Klinman DM, et al. Sequence analysis and expression of an x-linked, lymphocyte-regulated gene family (XLR). <i>J Exp Med.</i> 1987;166(6):1702–1715.



**Supplementary Figure 3.1. Mice immunized against MiHAs survive better than mice immunized against LAAs when challenged with 50,000 EL4 cells.** B6 or B10-congenic mice were immunized with peptide-pulsed DCs (day -14 and -7) and received 50,000 EL4 cells i.v. on day 0. As a control, B6 mice were immunized with unpulsed DCs. Mice immunized with peptide-pulsed DCs (full blue or red line), B6 mice immunized with unpulsed DCs (black line).  $\tilde{x}$  represents the median survival time. A log-rank test was used to evaluate whether survival was different from that of the B6 control group (black line). Ten mice per group.

### 3.11 References

1. Bleakley, M. & Riddell, S.R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* **4**, 371-380 (2004).
2. Vincent, K., Roy, D.C. & Perreault, C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood* **118**, 2951-2959 (2011).
3. Jenq, R.R. & van den Brink, M.R. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 213-221 (2010).
4. Hsieh, M.H., Patterson, A.E. & Korngold, R. T-cell subsets mediate graft-versus-myeloid leukemia responses via different cytotoxic mechanisms. *Biol Blood Marrow Transplant* **6**, 231-240 (2000).
5. Hsieh, M.H. & Korngold, R. Differential use of FasL- and perforin-mediated cytolytic mechanisms by T-cell subsets involved in graft-versus-myeloid leukemia responses. *Blood* **96**, 1047-1055 (2000).
6. Reddy, P., *et al.* A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med* **11**, 1244-1249 (2005).
7. Schmaltz, C., *et al.* T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med* **8**, 1433-1437 (2002).
8. Matte-Martone, C., Liu, J., Jain, D., McNiff, J. & Shlomchik, W.D. CD8+ but not CD4+ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4+ and CD8+ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL. *Blood* **111**, 3884-3892 (2008).
9. Spierings, E., *et al.* A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications. *PLoS One* **1**, e42 (2006).
10. Roopenian, D., Choi, E.Y. & Brown, A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev* **190**, 86-94 (2002).
11. Spierings, E., *et al.* Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations. *PLoS Genet* **3**, e103 (2007).
12. Warren, E.H., *et al.* Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood* **120**, 2796-2806 (2012).

13. Pion, S., Fontaine, P., Baron, C., Gyger, M. & Perreault, C. Immunodominant minor histocompatibility antigens expressed by mouse leukemic cells can serve as effective targets for T cell immunotherapy. *J Clin Invest* **95**, 1561-1568 (1995).
14. Hobo, W., *et al.* Association of disparities in known minor histocompatibility antigens with relapse-free survival and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **19**, 274-282 (2013).
15. Broen, K., Greupink-Draaisma, A., Fredrix, H., Schaap, N. & Dolstra, H. Induction of multiple myeloma-reactive T cells during post-transplantation immunotherapy with donor lymphocytes and recipient DCs. *Bone Marrow Transplant* **47**, 1229-1234 (2012).
16. Hambach, L. & Goulmy, E. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* **17**, 202-210 (2005).
17. Spierings, E., *et al.* Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **19**, 1244-1253 (2013).
18. Hambach, L., *et al.* Human cytotoxic T lymphocytes specific for a single minor histocompatibility antigen HA-1 are effective against human lymphoblastic leukaemia in NOD/scid mice. *Leukemia* **20**, 371-374 (2006).
19. Hambach, L., *et al.* Targeting a single mismatched minor histocompatibility antigen with tumor-restricted expression eradicates human solid tumors. *Blood* **112**, 1844-1852 (2008).
20. Mollidrem, J.J., *et al.* Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* **6**, 1018-1023 (2000).
21. Rezvani, K., *et al.* Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **110**, 1924-1932 (2007).
22. Lindahl, K.F. Minor histocompatibility antigens. *Trends Genet* **7**, 219-224 (1991).
23. DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L.M., Cheung, A.F. & Jacks, T. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* **482**, 405-409 (2012).
24. Cancer Genome Atlas Research, N., *et al.* Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **368**, 2059-2074 (2013).

25. van den Brink, M.R., *et al.* Relapse after allogeneic hematopoietic cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* **16**, S138-145 (2010).
26. Miller, J.S., *et al.* NCI First International Workshop on The Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from the Committee on the Biology Underlying Recurrence of Malignant Disease following Allogeneic HSCT: Graft-versus-Tumor/Leukemia Reaction. *Biol Blood Marrow Transplant* **16**, 565-586 (2010).
27. de Verteuil, D., *et al.* Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol Cell Proteomics* **9**, 2034-2047 (2010).
28. Caron, E., *et al.* The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol Syst Biol* **7**, 533 (2011).
29. Rock, K.L., Gramm, C. & Benacerraf, B. Low temperature and peptides favor the formation of class I heterodimers on RMA-S cells at the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4200-4204 (1991).
30. Kessler, J.H., *et al.* Competition-based cellular peptide binding assays for 13 prevalent HLA class I alleles using fluorescein-labeled synthetic peptides. *Hum Immunol* **64**, 245-255 (2003).
31. Roy-Proulx, G., Baron, C. & Perreault, C. CD8 T-cell ability to exert immunodomination correlates with T-cell receptor: epitope association rate. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**, 260-271 (2005).
32. Fortier, M.H., *et al.* The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J Exp Med* **205**, 595-610 (2008).
33. Tan, C.T., Croft, N.P., Dudek, N.L., Williamson, N.A. & Purcell, A.W. Direct quantitation of MHC-bound peptide epitopes by selected reaction monitoring. *Proteomics* **11**, 2336-2340 (2011).
34. Zuberi, A.R., Christianson, G.J., Mendoza, L.M., Shastri, N. & Roopenian, D.C. Positional cloning and molecular characterization of an immunodominant cytotoxic determinant of the mouse H3 minor histocompatibility complex. *Immunity* **9**, 687-698 (1998).
35. Yadav, R., *et al.* The H4b minor histocompatibility antigen is caused by a combination of genetically determined and posttranslational modifications. *J Immunol* **170**, 5133-5142 (2003).



36. Eden, P.A., *et al.* Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6dom1) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J Immunol* **162**, 4502-4510 (1999).
37. McBride, K., *et al.* The model B6(dom1) minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast STT3 gene. *Immunogenetics* **54**, 562-569 (2002).
38. Mendoza, L.M., *et al.* Minors held by majors: the H13 minor histocompatibility locus defined as a peptide/MHC class I complex. *Immunity* **7**, 461-472 (1997).
39. Ostrov, D.A., *et al.* How H13 histocompatibility peptides differing by a single methyl group and lacking conventional MHC binding anchor motifs determine self-nonself discrimination. *J Immunol* **168**, 283-289 (2002).
40. Lyon, M.F., Searle, A.G. & International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*, (Oxford University Press ;G. Fischer Verlag, Oxford England ; New York Stuttgart, 1989).
41. Fontaine, P., *et al.* Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med* **7**, 789-794 (2001).
42. Laugel, B., *et al.* Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties. *J Biol Chem* **282**, 23799-23810 (2007).
43. Stone, J.D., *et al.* Interaction of streptavidin-based peptide-MHC oligomers (tetramers) with cell-surface TCRs. *J Immunol* **187**, 6281-6290 (2011).
44. Davis, M.M., Altman, J.D. & Newell, E.W. Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis. *Nat Rev Immunol* **11**, 551-558 (2011).
45. Bihl, F., *et al.* Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses. *J Immunol* **176**, 4094-4101 (2006).
46. Gallimore, A., Dumrese, T., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. & Rammensee, H.G. Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides. *J Exp Med* **187**, 1647-1657 (1998).

47. Busch, D.H. & Pamer, E.G. MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, *in vitro* proliferation, and diversity of responding CTL. *J Immunol* **160**, 4441-4448 (1998).
48. Pion, S., Christianson, G.J., Fontaine, P., Roopenian, D.C. & Perreault, C. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* **93**, 952-962 (1999).
49. Wherry, E.J., Puorro, K.A., Porgador, A. & Eisenlohr, L.C. The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained. *J Immunol* **163**, 3735-3745 (1999).
50. Yewdell, J.W. & Bennink, J.R. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* **17**, 51-88 (1999).
51. Bullock, T.N., Colella, T.A. & Engelhard, V.H. The density of peptides displayed by dendritic cells affects immune responses to human tyrosinase and gp100 in HLA-A2 transgenic mice. *J Immunol* **164**, 2354-2361 (2000).
52. Derby, M., Alexander-Miller, M., Tse, R. & Berzofsky, J. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J Immunol* **166**, 1690-1697 (2001).
53. Roy-Proulx, G., Meunier, M.C., Lanteigne, A.M., Brochu, S. & Perreault, C. Immunodomination results from functional differences between competing CTL. *Eur J Immunol* **31**, 2284-2292 (2001).
54. Almeida, J.R., *et al.* Antigen sensitivity is a major determinant of CD8<sup>+</sup> T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* **113**, 6351-6360 (2009).
55. Moutaftsi, M., *et al.* Correlates of protection efficacy induced by vaccinia virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes in the murine intranasal challenge model. *Eur J Immunol* **39**, 717-722 (2009).
56. Berger, C.T., *et al.* High-functional-avidity cytotoxic T lymphocyte responses to HLA-B-restricted Gag-derived epitopes associated with relative HIV control. *J Virol* **85**, 9334-9345 (2011).
57. Jenkins, M.K. & Moon, J.J. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol* **188**, 4135-4140 (2012).

58. Nauerth, M., *et al.* TCR-ligand koff rate correlates with the protective capacity of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells for adoptive transfer. *Sci Transl Med* **5**, 192ra187 (2013).
59. Zhong, S., *et al.* T-cell receptor affinity and avidity defines antitumor response and autoimmunity in T-cell immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6973-6978 (2013).
60. Granados, D.P., *et al.* MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements. *Blood* **119**, e181-191 (2012).
61. Karosiene, E., Lundegaard, C., Lund, O. & Nielsen, M. NetMHCcons: a consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions. *Immunogenetics* **64**, 177-186 (2012).
62. Kotturi, M.F., *et al.* Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the degree of epitope diversity shape CD8<sup>+</sup> T cell immunodominance. *J Immunol* **181**, 2124-2133 (2008).
63. Almeida, J.R., *et al.* Superior control of HIV-1 replication by CD8<sup>+</sup> T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* **204**, 2473-2485 (2007).
64. Perreault, C., Roy, D.C. & Fortin, C. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol Today* **19**, 69-74 (1998).
65. Burrows, S.R., *et al.* Peptide-MHC class I tetrameric complexes display exquisite ligand specificity. *J Immunol* **165**, 6229-6234 (2000).
66. Buslepp, J., *et al.* T cell activity correlates with oligomeric peptide-major histocompatibility complex binding on T cell surface. *J Biol Chem* **276**, 47320-47328 (2001).
67. Hernandez, J., Lee, P.P., Davis, M.M. & Sherman, L.A. The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire. *J Immunol* **164**, 596-602 (2000).
68. de Verteuil, D., Granados, D.P., Thibault, P. & Perreault, C. Origin and plasticity of MHC I-associated self peptides. *Autoimmun Rev* **11**, 627-635 (2012).
69. Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Huppa, J.B. & Davis, M.M. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* **5**, 524-530 (2004).
70. Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M. & Valitutti, S. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10985-10990 (2006).

71. Morgan, R.A., *et al.* Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* **36**, 133-151 (2013).
72. St-Pierre, C., *et al.* Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci Rep* **3**, 1860 (2013).
73. Ochsenreither, S., *et al.* Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen. *Blood* **119**, 5492-5501 (2012).
74. Robbins, P.F., *et al.* Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* **19**, 747-752 (2013).
75. Aleksic, M., *et al.* Dependence of T cell antigen recognition on T cell receptor-peptide MHC confinement time. *Immunity* **32**, 163-174 (2010).

## **Chapitre 4**

IDENTIFICATION DES ANTIGÈNES SPÉCIFIQUES AUX TUMEURS

## **4. Méthodes permettant l'identification d'antigènes spécifiques aux tumeurs**

De plus en plus d'évidences suggèrent que les TSA représentent une cible de choix pour l'immunothérapie du cancer. Cependant, malgré leur grand intérêt thérapeutique, l'identification des TSA dérivant de transcrits portant des mutations somatiques a été limitée par le fait que ces derniers sont cancer-spécifiques et donc, que leur identification doit être faite pour chaque individu<sup>1,2</sup>. Du point de vue d'un lymphocyte T, les TSA et les MiHA sont conceptuellement identiques : ils sont spécifiques à un ou des individus et sont différents de la séquence dite « normale », c'est-à-dire la séquence de référence. Ainsi, les méthodes d'identification des MiHA et des TSA sont essentiellement identiques et peuvent être divisées en deux catégories : les approches d'immunologie directes ou les approches d'immunologie inversées. Les méthodes d'identification utilisées au début des années 1990 dans la souris d'abord et chez l'humain ensuite, n'ont permis la caractérisation de ces antigènes qu'à petite échelle. Les avancées technologiques permettant d'identifier des antigènes dérivant d'altérations génétiques, qu'elles soient somatiques ou germinales, ont été bénéfiques dans les deux domaines et ont permis l'identification à grande échelle de nombreux MiHA et TSA. Ce chapitre donc représente un addendum à l'introduction, afin de mettre en contexte les méthodes utilisées pour identifier à grande échelle des antigènes présentés à la surface cellulaire par les molécules du CMH.

## 4.1 Les approches d'immunologie directes

Les approches d'immunologie directes reposent d'abord sur l'identification et l'isolation de lymphocytes T ayant été activé par un antigène, suivit de l'élucidation de la séquence de cet antigène. Cette approche permet donc une identification qui est indépendante de la restriction de présentation antigénique dans un contexte de CMH I ou de CMH II<sup>3</sup>. Néanmoins, elle ne permet d'identifier seulement les TSA les plus immunogènes puisqu'elle ne sélectionne que ceux qui ont activé les lymphocytes T<sup>4</sup>. De plus, elle peut également mener à l'identification de faux positifs puisque les conditions de cultures peuvent entraîner des réponses non-spécifiques et mener à l'activation de lymphocytes T par réactivité croisée<sup>5</sup>. Ce genre d'approche a permis l'identification des premiers TSA humains, grâce à l'utilisation de clones de lymphocytes T et de bibliothèques d'ADNc de mélanome<sup>6</sup>, qui sont d'abord incubés ensemble afin d'isoler les CTL réactifs pour ensuite être analysés afin de déterminer les séquences peptidiques minimales ayant permis leur activation<sup>3,7</sup>. Malgré que cette approche soit laborieuse et ne permette l'identification d'un nombre restreint de candidats à la fois, elle a tout de même permis l'identification de centaines de TSA, parmi lesquels la séquence minimale et la restriction au CMH d'une cinquantaine ont été confirmées<sup>8</sup>.

## 4.2 Les approches d'immunologie inversées

Le développement et l'accessibilité des nouvelles méthodes de séquençage et de divers outils pour analyser ces données ont permis le développement d'approches d'immunologie inversées pour l'identification d'antigènes dérivant d'altérations génétiques<sup>1</sup>. Cette approche *in silico* repose essentiellement sur la comparaison de données de séquençage d'exome entre des cellules cancéreuses et leur contrepartie normale, permettant l'identification de mutations spécifiques aux tumeurs, dont l'expression est ensuite confirmée par séquençage d'ARN. Ces mutations identifiées au niveau génomique doivent ensuite être analysées pour déterminer si une séquence peptidique comportant la mutation peut être présentée à la surface cellulaire et si celles-ci peuvent générer des réponses immunitaires. Pour ce faire, diverses approches sont favorisées, telles que la prédiction de l'affinité des candidats pour les molécules du CMH, leur expression et la fréquence des mutations<sup>9</sup> ou la validation de leur expression à la surface cellulaire par des essais de stimulation de lymphocytes T ou par spectrométrie de masse<sup>10,11</sup>.

### 4.2.1 Évaluation de la probabilité de présentation de l'antigène par prédiction de son affinité pour les molécules du CMH

Suite à l'identification d'une mutation cancer-spécifique, les nucléotides en amont et en aval de la mutation sont extraits afin de générer des polypeptides de 25 acides aminés avec la mutation localisée au centre de la séquence. Celle-ci est alors fragmentée de façon à générer tous les peptides possibles portant la mutation, puis chaque peptide est évalué *in silico* pour sa capacité à lier les molécules du CMH. Les meilleurs candidats sont alors synthétisés et utilisés pour charger les cellules tumorales afin d'évaluer leur immunogénicité. Cette approche a ainsi permis l'identification de plusieurs antigènes liant les molécules de classe I et de classe II du CMH<sup>6,12-14</sup>.

Les approches visant à identifier des antigènes immunogènes en utilisant des algorithmes de prédiction sont intéressantes puisqu'elles ne sont pas restreintes par la nécessité d'obtenir des lymphocytes T pour la résolution de la séquence du peptide. Malgré cela, elles comportent certaines limitations puisque les algorithmes ne sont en mesure de prédire efficacement l'affinité des peptides pouvant lier les molécules du CMH de classe II<sup>1,7,15,16</sup>. De plus, les algorithmes de prédiction ne sont efficaces que pour les allèles codant pour les molécules du CMH les plus communes dans la population et pour les peptides avec une restriction de longueur typique, c'est-à-dire ceux d'une longueur de 8 à 10 acides aminés, particulièrement les peptides de 9 acides aminés. Finalement, ils ne considèrent pas les processus cellulaires menant à la présentation des peptides<sup>17</sup>. Ainsi, d'autres algorithmes ont été développés afin de reproduire *in silico* les étapes de l'apprêtement de l'antigène<sup>18-20</sup>. Néanmoins, ces derniers sont encore peu fiables et reflètent une mauvaise compréhension des paramètres dictant la sélection des peptides pour la présentation antigénique<sup>1</sup>.

Bien que l'affinité du peptide pour les molécules du CMH soit indicative de son potentiel immunogène, elle ne permet qu'une approximation des candidats à prioriser pour l'immunothérapie du cancer. Ainsi, malgré sa facilité d'utilisation et son applicabilité dans les pratiques cliniques, cette approche favorise l'identification de nombreux faux positifs<sup>1,21</sup>. En effet, des analyses effectuées sur des échantillons provenant de mélanomes humains ont permis d'identifier 229 candidats parmi lesquels seulement 10 ont été en mesure d'activer des lymphocytes T. Ainsi, moins de 5% des antigènes identifiés grâce à des algorithmes de



prédictions sont capables d'induire des réponses immunitaires<sup>22-25</sup>. De nombreuses analyses *in vitro* et *in vivo* sont donc nécessaires afin de valider le potentiel immunogène des candidats identifiés par ces approches<sup>17</sup>. De plus, bien que des analyses prospectives de TIL aient permis de déterminer que les peptides ayant les meilleures affinités pour les molécules du CMH étaient ceux qui induisaient les meilleures réponses immunitaires<sup>26,27</sup>, d'autres études ont démontré que des peptides prédits comme ayant une faible affinité pour les molécules du CMH sont néanmoins capables de générer des réponses immunitaires<sup>28</sup>. Ainsi, si un seuil d'affinité de 500 nM est généralement considéré comme étant adéquat pour identifier les peptides de haute affinité pour les molécules du CMH, ce seuil n'est pas universel pour tous les allèles<sup>29</sup>. L'utilisation du rang plutôt que de la valeur absolue d'affinité permet de normaliser les variations entre les différents allèles et de limiter le nombre de faux négatifs<sup>15</sup>.

#### **4.2.2 Validation de l'expression de l'antigène par sa capacité à activer des lymphocytes T**

Afin de mieux prioriser les antigènes à cibler suite à leur identification dans les données de séquençage et pour contourner l'utilisation des algorithmes de prédiction d'affinité pour les molécules du CMH, une approche utilisant des minigènes en tandem a été développée<sup>25</sup>. Dans cette technique, les séquences en amont et en aval de la mutation sont isolées de façon à inclure 12 codons de part et d'autre de la mutation. Entre 6 et 24 séquences nucléotidiques sont ensuite liées en tandem et insérées dans un plasmide pour être transférées dans des cellules présentatrices d'antigènes du patient qui sont alors incubées avec les lymphocytes T. Lorsqu'une réponse immunitaire est observée, les minigènes peuvent être déconvolués pour identifier la séquence minimale de l'antigène ayant mené à l'activation du lymphocyte T<sup>25</sup>. Cette approche a principalement été utilisée dans des analyses prospectives de patients ayant reçu une thérapie par les TIL et ayant bénéficié de réponses anti-tumorales<sup>22,30-33</sup>. Par exemple, 45 mutations dans 21 patients atteints de mélanome métastatique ont été identifiées dans le contexte de présentation de classe I et de classe II grâce à cette approche<sup>25</sup>. Dans une autre étude, l'analyse de TIL autologues ou des lymphocytes isolés du sang de 31 patients atteints de mélanome a permis d'identifier 75 néoantigènes exprimés dans 29 patients<sup>34</sup>. Deux études indépendantes ont également permis l'identification de 17 mutations supplémentaires dans 4 patients atteints de mélanome<sup>22,33</sup>. Finalement, l'analyse de 35 patients atteints de cancers gastrointestinaux

(œsophage, colon, pancréas, gastrique, canal biliaire) a permis d'identifier 73 mutations exprimées chez 31 patients. De façon très intéressante, cette étude a également permis de démontrer des réponses cliniques sans toxicité pour deux patients suite à l'injection de TIL dirigés contre un néoantigène<sup>35,36</sup>. Le principal avantage de ce type de technique est que les cellules présentatrices d'antigènes vont apprêter et présenter les peptides dans le bon contexte CMH, avec les bonnes restrictions de longueur et de classe de CMH. Néanmoins, il est possible que l'induction de l'expression des antigènes dans les cellules force une expression des transcrits à des niveaux non-physiologique et pouvant mener à la présentation de certains antigènes qui ne seraient normalement pas détectés de façon endogène, augmentant ainsi l'identification de faux positifs. De plus, la quantité importante de matériel nécessaire pour valider le grand nombre de candidats identifiés fait en sorte que ces approches sont davantage intéressantes dans un contexte de validation d'antigènes que dans un contexte d'identification. Finalement, des lymphocytes T réactifs à des TSA ont également été isolés grâce à l'utilisation de tétramères conventionnels ou synthétisés grâce à une technique à haut débit utilisant l'échange de peptides médié par l'irradiation UV<sup>37</sup> et ont permis l'identification de 11 néoantigènes chez 9 patients atteints de mélanome<sup>31,38</sup>.

### **4.2.3 Validation de l'expression de l'antigène par spectrométrie de masse**

L'utilisation de la spectrométrie de masse (MS) pour identifier des antigène permet l'identification du répertoire de peptides associés aux molécules du CMH présenté naturellement à la surface de cellules cancéreuses, de tumeurs entières, de tissus sains et de fluides corporels<sup>10</sup>. Exploitée depuis les années 1990 par le groupe de Rammensee d'abord, l'élution douce à l'acide des peptides suivie d'une identification par MS a depuis été utilisée pour l'identification de peptides dans le mélanome principalement<sup>39,40</sup>, mais également dans plusieurs autres types de cancers<sup>41</sup>, sans toutefois y inclure les mutations spécifiques de l'échantillon. L'identification de peptides par MS repose sur la comparaison d'un spectre observé, représentant la signature moléculaire d'un fragment séquencé, à des spectres théoriques, qui représentent toutes les séquences présentes dans une base de données, afin d'associer une séquence peptidique à un spectre (PSM). Puis, comme pour les analyses de prédiction de peptides *in silico*, les candidats identifiés en MS sont validés pour leur potentiel immunogène *in vitro*. Cependant, puisque les candidats identifiés sont réellement exprimés à la

surface cellulaire, leur nombre est bien moindre dans les approches par MS que dans celles par prédiction *in silico*, facilitant leur validation *in vitro*<sup>10</sup>.

De façon générale, ces bases de données incluent toutes les protéines provenant de séquences codantes du génome et ont permis l'identification et la validation de nombreux TAA. Néanmoins, ce genre de base de données ne permet que l'identification de peptides avec des séquences connues et fait abstraction de toute séquence provenant de mutations ou n'étant pas exprimée dans les portions codantes du génome<sup>42</sup>. De fait, depuis quelques années, des approches d'immunologie inversées combinent les analyses de données de séquençage à la spectrométrie de masse<sup>43-46</sup> afin d'identifier des antigènes dérivant d'altérations génétiques. Ces approches de spectrométrie de masse informée par la génomique, dites approches de protéogénomiques, ont l'avantage d'apporter la validation directe de la présence d'un TSA à la surface cellulaire<sup>47,48</sup>. La recherche de peptides grâce à des bases de données protéiques personnalisées, c'est-à-dire incluant les mutations spécifiques à l'échantillon, n'est techniquement pas compliquée puisqu'elle ne requiert que l'inclusion des événements d'altération génétiques personnels à l'échantillon dans la base de donnée de référence. Néanmoins, bien que son avantage principal soit la détection des peptides présentés naturellement et dans le bon contexte HLA, la quantité de matériel nécessaire à la détection de peptides faiblement présentés représente le principal obstacle à son application dans les pratiques cliniques courantes<sup>10</sup>. En effet, le processus d'extraction des peptides depuis les cavités des molécules du CMH, combiné à la faible sensibilité des appareils de MS ne permettrait l'analyse que de 0,5 à 3% de l'ensemble des peptides présentés à la surface cellulaire<sup>49</sup>. Néanmoins, les approches de protéogénomiques ont permis l'identification nouvelle de nombreuses séquences peptidiques chez la souris comme chez l'homme<sup>42,48,50-55</sup>, incluant des TSA<sup>21,44-46</sup>. De plus, ces approches ont permis de mettre en évidence que des peptides portant des modifications post-traductionnelles peuvent induire une reconnaissance antigénique par les lymphocytes T, peptides qui n'aurait pu être identifiés grâce aux techniques de prédiction *in silico*<sup>56,57</sup>.

Une étude a récemment utilisé des données de séquençage d'exome pour comparer les approches d'identification de peptides par prédiction *in silico* ou par MS et a démontré que seule une petite portion des peptides prédits *in silico* sont réellement détectés en spectrométrie de masse<sup>44</sup>. Ces travaux mettent en lumière les avantages et les inconvénients inhérents à ces deux

méthodes. D'une part, la priorisation des antigènes par des méthodes de prédiction *in silico* entraîne l'inclusion de plusieurs faux positifs dans les candidats potentiels<sup>7,58</sup>. D'autre part, bien que la validation de la présence de peptides à la surface cellulaire par la MS semble efficace pour éliminer les faux positifs introduits par les méthodes de prédiction *in silico*, cette méthode peut également introduire des faux négatifs de par son manque de sensibilité<sup>10,59</sup>. De fait, une absence de détection en MS ne signifie pas nécessairement une absence de présentation du peptide à la surface des cellules analysées.

Peu importe l'approche de priorisation des antigènes sélectionnée, les données de séquençage d'exome sont maintenant couramment utilisées pour l'identification de TSA à grande échelle. Malgré l'identification de centaines de ces antigènes dérivant majoritairement de SNV non-synonymes<sup>9</sup> et de quelques InDel<sup>60</sup>, ces approches n'ont permis l'identification que d'environ 2 mutations immunogènes par patients, et ce, peu importe la charge mutationnelle des tumeurs<sup>23-25,28,44,45,61-64</sup>.

### **4.3 Ce qu'il manque dans les analyses actuelles**

Ces résultats soulèvent une question très importante pour l'avenir de l'immunothérapie ciblant les TSA : Le faible taux d'identification des TSA immunogène peut-il s'expliquer par le fait que très peu de mutations sont effectivement présentées à la surface des cellules cancéreuses ou par le fait qu'il existe des failles dans les méthodes d'identification actuelles? D'une part, bien que le génome comporte 3 milliard de nucléotides, seules 30 millions de bases, soit 1%, composeraient la portion codante<sup>1</sup>. De plus, une analyse du répertoire de peptides présenté par des B-LCLs provenant de 19 individus sains a permis de démontrer qu'environ 10% des régions codantes connues du génome sont responsable de la génération des peptides du CMH<sup>65</sup>. Finalement, on estime que moins de 1% des mutations somatiques dans le cancer sont localisées dans les régions codantes<sup>66</sup>. Ainsi, la probabilité qu'une mutation identifiée dans l'exome des cellules cancéreuse soit détectée à la surface cellulaire est très faible. Néanmoins, plusieurs groupes privilégient l'analyse de l'exome de patients atteints de cancer afin de favoriser un séquençage en profondeur des mutations présentes dans les portions codantes du génome<sup>1,59</sup>. Ceci pose deux problèmes potentiels dans l'identification de TSA pour l'immunothérapie du cancer. D'abord, l'utilisation de méthodes de séquençage qui sont restreintes aux régions

codantes du génome serait techniquement applicable uniquement face aux cas de cancers hautement mutés<sup>32,35</sup>. De plus, des travaux effectués dans notre laboratoire ont démontré que les régions non-codantes du génome contribuent de façon significative au répertoire de peptides présentés à la surface cellulaire<sup>67</sup>. Finalement, de façon générale, les méthodes conventionnelles d'analyse des données de séquençage ne permettent que la prédiction fiable des mutations d'un ou de quelques nucléotides. Ainsi, les peptides dérivant de longues InDel, de translocation, de modifications d'épissage, de fusions, d'altérations épigénétiques et des modifications post-traductionnelles sont perdus<sup>1</sup>. Collectivement, ces données supportent l'hypothèse que le faible taux d'identification des TSA immunogène peut s'expliquer, au moins en partie, par le fait qu'il existe des failles dans les méthodes présentement utilisées pour identifier des mutations dans les données de séquençage.

#### **4.4 Comment améliorer l'identification de peptides par MS**

Les bases de données personnalisées utilisent les mutations de hautes qualités identifiées grâce au séquençage d'exome, dont l'expression est confirmée dans les données de séquençage d'ARN. Ces mutations sont intégrées dans le génome de référence, qui est ensuite traduit en protéines pour être utilisées comme base de données en MS. Puisque l'identification adéquate de peptides en MS dépend de l'exactitude de la base de données, ainsi que de la sensibilité de détection et de la spécificité des PSM, une alternative à cette approche est d'intégrer dans le génome personnalisé, seulement les protéines traduites *in silico* pour lesquelles l'expression est confirmée par les données de séquençage d'ARN<sup>44,68</sup>. Néanmoins, du fait que ces approches n'intègrent que les transcrits traduits dans les cadres de lecture canoniques, elles ne sont en mesure d'identifier seulement des peptides normaux et des peptides dérivant de mutations somatiques ou des petites insertions et délétions.

Pour intégrer dans une base de données toutes les séquences provenant de traduction canoniques ou non-canoniques, des traductions de données de séquençage dans les 6 cadres de lecture ont été effectuées. La base de données ainsi générée est essentiellement composée de 5 séquences protéiques inexistantes dans la cellule pour chaque séquence protéique réelle, en plus d'être très volumineuse<sup>42</sup>. La notion d'intégrer n'importe quelle séquence d'intérêt dans une base de données protéique soulève donc plusieurs questionnements quant à la qualité des PSM

dans ces bases de données de plus en plus volumineuses<sup>42</sup>. En effet et contre intuitivement, la taille de la base de données corrèle négativement avec la qualité des PSM. Puisque les spectres observés sont associés à des spectres théoriques, plus l'abondance de ces derniers est grande, plus les assignations de spectres sont faites avec haute certitude mais de façons incorrectes, rendant la distinction entre les vrais et les faux positifs très difficile<sup>42,69-71</sup>. De fait, une traduction dans les 6 cadres de lecture peut entraîner une perte de 30% et plus du nombre d'identification par rapport à celles faites avec le protéome de référence<sup>72</sup>.

Finalement, il est également faux de restreindre la base de données uniquement aux séquences recherchées et de plus en plus d'études démontrent que celle-ci doit contenir l'information qu'on s'attend à trouver dans les cellules. Ainsi, la génération d'une base de données n'incluant que les séquences portant des altérations génétiques et faisant abstraction des séquences normales permet la génération d'une petite base de données, mais entraîne une augmentation du taux de faux positifs. En effet, ce genre de base de données force l'association d'un spectre généré par un peptide exclu de la base de données à des séquences présentes dans la base de données<sup>69,73</sup>.

Afin de caractériser de façon exhaustive le répertoire de peptides présentés à la surface des cellules cancéreuses, la base de données parfaite pour l'identification de TSA devrait donc contenir les séquences normales et provenant des altérations génétiques, traduites dans les cadres de lecture canonique ou non-canonique, le tout dans une base de données de taille restreinte. Le prochain chapitre porte donc sur le une approche protéogénomique que nous avons développé afin d'identifier tous les types de TSA, qu'ils proviennent de réarrangements simples tels des mutations somatiques non-synonymes ou plus complexes, tel que des fusions ou des larges InDel, de même que ceux provenant de transcrits exprimés de façon aberrante dans les cellules cancéreuses.

## 4.5 Références

1. Yarchoan, M., Johnson, B.A., 3rd, Lutz, E.R., Laheru, D.A. & Jaffee, E.M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* **17**, 209-222 (2017).
2. Melero, I., *et al.* Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 509-524 (2014).
3. Spierings, E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens* **84**, 374-360 (2014).
4. Marijt, W.A., *et al.* Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2742-2747 (2003).
5. Popovic, J., *et al.* The only proposed T-cell epitope derived from the TEL-AML1 translocation is not naturally processed. *Blood* **118**, 946-954 (2011).
6. Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **14**, 135-146 (2014).
7. Lu, Y.C. & Robbins, P.F. Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Semin Immunol* **28**, 22-27 (2016).
8. Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immun* **13**, 15 (2013).
9. Sahin, U., *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **547**, 222-226 (2017).
10. Bassani-Sternberg, M. & Coukos, G. Mass spectrometry-based antigen discovery for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **41**, 9-17 (2016).
11. Stevanovic, S., *et al.* Landscape of immunogenic tumor antigens in successful immunotherapy of virally induced epithelial cancer. *Science* **356**, 200-205 (2017).
12. Matsushita, H., *et al.* Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* **482**, 400-404 (2012).
13. Castle, J.C., *et al.* Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* **72**, 1081-1091 (2012).
14. Cai, A., *et al.* Mutated BCR-ABL generates immunogenic T-cell epitopes in CML patients. *Clin Cancer Res* **18**, 5761-5772 (2012).

15. Nielsen, M. & Andreatta, M. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Med* **8**, 33 (2016).
16. Karosiene, E., *et al.* NetMHCIIpan-3.0, a common pan-specific MHC class II prediction method including all three human MHC class II isotypes, HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ. *Immunogenetics* **65**, 711-724 (2013).
17. Calis, J.J., *et al.* Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol* **9**, e1003266 (2013).
18. Larsen, M.V., *et al.* Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics* **8**, 424 (2007).
19. Peters, B., Bulik, S., Tampe, R., Van Endert, P.M. & Holzhutter, H.G. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J Immunol* **171**, 1741-1749 (2003).
20. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O. & Kesmir, C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. *Immunogenetics* **57**, 33-41 (2005).
21. Bassani-Sternberg, M., *et al.* Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun* **7**, 13404 (2016).
22. Robbins, P.F., *et al.* Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* **19**, 747-752 (2013).
23. Oostvogels, R., Lokhorst, H.M. & Mutis, T. Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives. *Bone Marrow Transplant* **51**, 163-171 (2016).
24. Linnemann, C., *et al.* High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med* **21**, 81-85 (2015).
25. Lu, Y.C., *et al.* Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. *Clin Cancer Res* **20**, 3401-3410 (2014).
26. Fritsch, E.F., *et al.* HLA-binding properties of tumor neoepitopes in humans. *Cancer Immunol Res* **2**, 522-529 (2014).
27. van Buuren, M.M., Calis, J.J. & Schumacher, T.N. High sensitivity of cancer exome-based CD8 T cell neo-antigen identification. *Oncoimmunology* **3**, e28836 (2014).



28. Duan, F., *et al.* Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J Exp Med* **211**, 2231-2248 (2014).
29. Paul, S., *et al.* HLA class I alleles are associated with peptide-binding repertoires of different size, affinity, and immunogenicity. *J Immunol* **191**, 5831-5839 (2013).
30. Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* **348**, 62-68 (2015).
31. Cohen, C.J., *et al.* Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *J Clin Invest* **125**, 3981-3991 (2015).
32. Gros, A., *et al.* Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med* **22**, 433-438 (2016).
33. Prickett, T.D., *et al.* Durable Complete Response from Metastatic Melanoma after Transfer of Autologous T Cells Recognizing 10 Mutated Tumor Antigens. *Cancer Immunol Res* **4**, 669-678 (2016).
34. Tran, E., Robbins, P.F. & Rosenberg, S.A. 'Final common pathway' of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations. *Nat Immunol* **18**, 255-262 (2017).
35. Tran, E., *et al.* Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science* **350**, 1387-1390 (2015).
36. Tran, E., *et al.* T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N Engl J Med* **375**, 2255-2262 (2016).
37. Rodenko, B., *et al.* Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat Protoc* **1**, 1120-1132 (2006).
38. van Rooij, N., *et al.* Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* **31**, e439-442 (2013).
39. Rotzschke, O., *et al.* Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* **348**, 252-254 (1990).
40. Cox, A.L., *et al.* Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* **264**, 716-719 (1994).
41. Hogan, K.T., *et al.* The peptide recognized by HLA-A68.2-restricted, squamous cell carcinoma of the lung-specific cytotoxic T lymphocytes is derived from a mutated elongation factor 2 gene. *Cancer Res* **58**, 5144-5150 (1998).
42. Nesvizhskii, A.I. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. *Nat Methods* **11**, 1114-1125 (2014).

43. Hombrink, P., *et al.* Discovery of T cell epitopes implementing HLA-peptidomics into a reverse immunology approach. *J Immunol* **190**, 3869-3877 (2013).
44. Yadav, M., *et al.* Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* **515**, 572-576 (2014).
45. Gubin, M.M., *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577-581 (2014).
46. Kalaora, S., *et al.* Use of HLA peptidomics and whole exome sequencing to identify human immunogenic neo-antigens. *Oncotarget* **7**, 5110-5117 (2016).
47. Hassan, C., *et al.* The human leukocyte antigen-presented ligandome of B lymphocytes. *Mol Cell Proteomics* **12**, 1829-1843 (2013).
48. Granados, D.P., *et al.* Proteogenomic-based discovery of minor histocompatibility antigens with suitable features for immunotherapy of hematologic cancers. *Leukemia* **30**, 1344-1354 (2016).
49. Hassan, C., *et al.* Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes. *J Proteomics* **109**, 240-244 (2014).
50. Ning, K. & Nesvizhskii, A.I. The utility of mass spectrometry-based proteomic data for validation of novel alternative splice forms reconstructed from RNA-Seq data: a preliminary assessment. *BMC Bioinformatics* **11 Suppl 11**, S14 (2010).
51. Menschaert, G., *et al.* Deep proteome coverage based on ribosome profiling aids mass spectrometry-based protein and peptide discovery and provides evidence of alternative translation products and near-cognate translation initiation events. *Mol Cell Proteomics* **12**, 1780-1790 (2013).
52. Sheynkman, G.M., Shortreed, M.R., Frey, B.L. & Smith, L.M. Discovery and mass spectrometric analysis of novel splice-junction peptides using RNA-Seq. *Mol Cell Proteomics* **12**, 2341-2353 (2013).
53. Wu, P., *et al.* Discovery of novel genes and gene isoforms by integrating transcriptomic and proteomic profiling from mouse liver. *J Proteome Res* **13**, 2409-2419 (2014).
54. Low, T.Y., *et al.* Quantitative and qualitative proteome characteristics extracted from in-depth integrated genomics and proteomics analysis. *Cell Rep* **5**, 1469-1478 (2013).
55. Omasits, U., *et al.* Directed shotgun proteomics guided by saturated RNA-seq identifies a complete expressed prokaryotic proteome. *Genome Res* **23**, 1916-1927 (2013).

56. Skipper, J.C., *et al.* 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 (1996).
57. Dalet, A., *et al.* An antigenic peptide produced by reverse splicing and double asparagine deamidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E323-331 (2011).
58. Polyakova, A., Kuznetsova, K. & Moshkovskii, S. Proteogenomics meets cancer immunology: mass spectrometric discovery and analysis of neoantigens. *Expert Rev Proteomics* **12**, 533-541 (2015).
59. Schreiber, T.N.S.a.R.D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 7 (2015).
60. Turajlic, S., *et al.* Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. *Lancet Oncol* **18**, 1009-1021 (2017).
61. Wick, D.A., *et al.* Surveillance of the tumor mutanome by T cells during progression from primary to recurrent ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **20**, 1125-1134 (2014).
62. Tran, E., *et al.* Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4<sup>+</sup> T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* **344**, 641-645 (2014).
63. Rizvi, N.A., *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124-128 (2015).
64. Rajasagi, M., *et al.* Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **124**, 453-462 (2014).
65. Pearson, H., *et al.* MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J Clin Invest* **126**, 4690-4701 (2016).
66. Khurana, E., *et al.* Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nat Rev Genet* **17**, 93-108 (2016).
67. Laumont, C.M., *et al.* Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nat Commun* **7**, 10238 (2016).
68. Granados, D.P., *et al.* Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat Commun* **5**, 3600 (2014).
69. Noble, W.S. Mass spectrometrists should search only for peptides they care about. *Nat Methods* **12**, 605-608 (2015).
70. Murphy, J.P., *et al.* MHC-I Ligand Discovery Using Targeted Database Searches of Mass Spectrometry Data: Implications for T-Cell Immunotherapies. *J Proteome Res* **16**, 1806-1816 (2017).

71. Nesvizhskii, A.I. A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. *J Proteomics* **73**, 2092-2123 (2010).
72. Blakeley, P., Overton, I.M. & Hubbard, S.J. Addressing statistical biases in nucleotide-derived protein databases for proteogenomic search strategies. *J Proteome Res* **11**, 5221-5234 (2012).
73. Sticker, A., Martens, L. & Clement, L. Mass spectrometrists should search for all peptides, but assess only the ones they care about. *Nat Methods* **14**, 643-644 (2017).

## **Chapitre 5**

### **Article:**

**Novel proteogenomic approach identifies noncanonical transcripts as a major source of tumor-specific antigens**

### **Référence de publication:**

Manuscrit en préparation

## **5. Novel proteogenomic approach identifies noncanonical transcripts as a major source of tumor- specific antigens**

Céline M. Laumont (M.Sc.)<sup>1,2,\*</sup>, Krystel Vincent (M.Sc.)<sup>1,2,\*</sup>, Leslie Hesnard (Ph.D.)<sup>1,2</sup>, Éric Audemard (Ph.D.)<sup>1</sup>, Éric Bonneil (Ph.D.)<sup>1</sup>, Jean-Philippe Laverdure (M.Sc.)<sup>1</sup>, Charles St-Pierre (M.Sc.)<sup>1,2</sup>, Mohamed Benhammadi (M.Sc.)<sup>1,2</sup>, Sébastien Lemieux (Ph.D.)<sup>1,3</sup>, Pierre Thibault (Ph.D.)<sup>1,4</sup> and Claude Perreault (M.D.)<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer,

<sup>2</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine,

<sup>3</sup> Department of Computer Science and Operations Research, Faculty of Arts and Sciences,

<sup>4</sup> Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Université de Montréal, PO Box 6128 Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

<sup>5</sup> Division of Hematology, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 de l'Assomption Boulevard, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4.

**\*Equally contributed to this work**

### **CORRESPONDENCE:**

Claude Perreault

Institute for Research in Immunology and Cancer

Université de Montréal

e-mail: (claude.perreault@umontreal.ca)

## 5.1 Mise en contexte de l'article

Les approches de thérapies personnalisées ciblant des antigènes présentés à la surface des cellules cancéreuses dépendent de la génération et de l'analyse de données de masse, lesquelles, de par le raffinement des technologies, deviennent de plus en plus complexes. Les objectifs de la seconde partie de cette thèse étaient d'abord de développer une méthode permettant d'identifier de façon rapide et reproductible, tous les types de TSA pouvant être présentés à la surface de cellules cancéreuses sélectionnées. Puis, nous avons validé le potentiel thérapeutique des candidats identifiés dans le but de 1) situer le potentiel anti-leucémique des TSA par rapport aux autres types d'antigènes étudiés jusqu'à présent et 2) déterminer si tous les types de TSA (dérivant de SNV, d'InDel ou de gènes exprimés de façon aberrante), ont un potentiel thérapeutique équivalent. Les résultats de ces travaux sont exposés dans le chapitre suivant sous forme de manuscrit en préparation.

Les cellules EL4 étant extrêmement mutées, les approches d'alignement conventionnel de données de séquençage d'ARN sur le génome de référence murin ont été remplacées par une approche plus sensible nommée profilage par *k-mers*. Les *k-mers* représentent une sous-séquence de nucléotides de longueur *k*, laquelle doit être suffisamment longue pour contenir une séquence peptidique complète (c'est-à-dire 8 acides aminés, donc 24 nucléotides), mais suffisamment courte pour qu'elle puisse être positionnées précisément dans le génome de référence. Ainsi, dans cette approche, les « reads » de cellules EL4 sont fragmentés en *k-mers* d'une longueur de 33 nucléotides, en déplaçant séquentiellement une fenêtre d'un nucléotide sur toute la longueur du « read ». La banque de données de *k-mers* résultante contient donc des séquences de 33 nucléotides, avec les régions avoisinantes sur chaque « reads » se chevauchant de 32 nucléotides, et est utilisée pour isoler les séquences EL4-spécifiques par l'approche détaillée dans le chapitre suivant.

## 5.2 Contribution des auteurs

**Krystel Vincent\*** : Conception du projet, mise en place et exécution expériences menant à la génération des figures 3, 4c, d et 5d, figures supplémentaires 5d, 7 et 8, analyse de tous les résultats, écriture de la première version du manuscrit.

**Céline M. Laumont\*** : Conception du projet, mise en place et exécution des analyses bioinformatiques menant à la génération du tableau 1 et des figures 1, 2, 5a, figures supplémentaires 1 à 4, analyse de tous les résultats, écriture de la première version du manuscrit.

**Leslie Hesnard** : Mise en place, exécution des expériences, analyse des résultats et contribution à l'écriture de la première version du manuscrit pour les figures 4a, b et 5b, figure supplémentaires 5a, b, c et 6

**Éric Audemard** : Conception et mise en place de Nektar

**Éric Bonneil** : Mise en place et à exécution des expériences de spectrométrie de masse

**Jean-Philippe Laverdure** : Mise en place et à exécution d'analyses bioinformatiques

**Charles St-Pierre** : Mise en place et exécution des expériences pour la génération des données de séquençage de cellules mTEC<sup>hi</sup>.

**Mohamed Benhammadi** : Exécution des expériences pour la génération des données de séquençage de cellules mTEC<sup>hi</sup>.

**Sébastien Lemieux et Pierre Thibault**: Analyse des résultats

**Claude Perreault** : Conception du projet, analyse des résultats et écriture de la première version du manuscrit.

\* Contribution égale à l'étude



## 5.3 Abstract

MHC I peptide complexes (pMHCs) are presented at the surface of all nucleated cells and play a central role in CD8 T cell immunosurveillance. pMHCs presented by medullary thymic epithelial cells (mTEC<sup>hi</sup>) are essential to eliminate self-reactive CD8 T cells in a process known as central tolerance. On cancer cells, non-tolerogenic pMHCs are referred to as tumor-specific antigens (TSAs) since they are absent from mTEC<sup>hi</sup> as well as any other normal cell. Despite their clinical relevance, identifying TSAs remains a challenge because of their scarcity and patient-specific nature. To expand the repertoire of TSAs per sample, we developed a proteogenomic approach, using RNA-sequencing data from cancer and normal-matched mTEC<sup>hi</sup> samples, able to identify TSAs deriving from (i) coding and non-coding regions of the genome, (ii) non-synonymous single-base mutations and more complex rearrangements and (iii) endogenous retroelements (ERE). This analysis led us to identify 5 TSAs, all of non-coding origin. Among them, two were aberrantly expressed, two derived from an ERE and one overlapped an EL4-specific mutation (deletion of ~ 7,500 bp). Using prophylactic vaccination with EL4-derived TSAs followed by EL4 cell injection, we found that mutated and ERE-derived TSAs generated the strongest antileukemic responses, although some degree of disease control was observed for aberrantly expressed TSAs. Moreover, when we dissected the mechanisms underlying the immunodominance of our TSAs, we found that both antigen clonality and T cell frequency were important parameters to assess antigen potency. Finally, we found that two of the most potent antigens (ERE-derived and large deletion) could be shared by multiple patients, thereby opening the idea of creating off-the-shelf therapies for truly cancer-specific antigens. In conclusion, we developed a fast and easy-to-implement proteogenomic platform able to identify the full landscape of TSAs in any given tumor, regardless of its mutational load or complexity, and identified metrics for the clinical prioritization of TSAs.

## 5.4 Introduction

CD8 T cells are known to be essential players in tumor eradication as the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in several cancers positively correlates with a good prognosis<sup>1</sup>. To eliminate tumor cells, CD8 T cells recognize tumor antigens, which are abnormal MHC I-associated peptides (MAPs) presented by tumor cells. A first class of tumor antigens are tumor-associated antigens (TAAs), which derive from normal sequences expressed in both normal and tumor cells, although their presentation may be abnormally high on tumor cells. Despite their potential to be shared amongst cancer patients, TAAs are poorly immunogenic and targeting them requires to breach central tolerance through the design of high-avidity TCRs, which have been shown to cause severe adverse effects in patients<sup>2,3</sup>. A second class of tumor antigens are tumor-specific antigens (TSAs), which can be defined as MAPs solely presented by cancer cells. These antigens can be divided in two categories: (i) aberrantly expressed TSAs (aeTSAs) caused by the aberrant expression of sequences usually silenced in normal cells and (ii) mutated TSAs (mTSAs), often referred to as neoantigens) derived from non-synonymous mutations that accumulates during tumorigenesis. TSAs' cancer-specific nature makes them ideal targets for T-cell-based cancer immunotherapy as no central tolerance should have been established against them, thereby preventing the deletion of high-avidity CD8 T cell repertoires known to trigger strong and durable antitumor responses<sup>4-6</sup>. To leverage such promising targets, several research groups have tried to characterize the landscape of mTSAs by sequencing both tumor and normal-matched whole exome in order to identify cancer-specific non-synonymous single-base mutations<sup>7</sup> or short insertion/deletions (InDels)<sup>8</sup>, whose expression is then confirmed by RNA-sequencing the tumor. Such information can then be used to identify mTSAs by mass spectrometry<sup>9</sup> or to predict their presentation by *in silico* translating all mutation-centered nucleotide sequences to yield potential mTSAs. These antigens are then prioritized according to their predicted binding affinity, expression level and variant allele frequency for vaccination<sup>7</sup>. In all cases, these studies report very few mTSAs, of which even fewer show clinical benefits. As prefigured by the fact that the overall MAP repertoire samples ~10% of all known coding regions<sup>10</sup>, these data highlight the scarcity of exonic mTSAs, which in turn restricts the use and benefits of T-cell-based cancer immunotherapy to cancers with a high mutational load<sup>11,12</sup>. In the case of melanoma, the cancer type with the highest mutation load,

MS analyses have uncovered a mean of 2 TSAs per individual tumors<sup>13</sup>, and only a handful of TSAs has been found in other types of primary tumors

To increase the range of cancers targetable by T-cell-based immunotherapy, we explored several conceptual avenues that could significantly expand the landscape of actionable mTSAs and aeTSAs. First, the mutational landscape of cancer cells goes beyond single-base mutations and short InDels. More complex rearrangements, such as large InDels or fusions, can be very common in several cancer types, ranging from leukemias<sup>14</sup> to prostate cancers<sup>15</sup> and melanomas<sup>16</sup>. Second, about ~99% of cancer mutations are located in non-coding regions of the genome<sup>17</sup>, which are known to significantly contribute to the MAP repertoire<sup>18</sup>. In fact, these so-called cryptic MAPs, by opposition to conventional MAPs that derive from the in-frame translation of known protein-coding genes, can derive from the out-of-frame translation of known protein-coding genes and the translation of allegedly non-coding regions. Moreover, we have shown that their MAP-coding sequences (**MCS**) overlap with significantly more non-synonymous germline polymorphisms than conventional ones, thereby leading to the production of mutated cryptic MAPs that are immunogenic<sup>18</sup>. Consequently, we expect cryptic MCS overlapping cancer-specific mutations to generate immunogenic cryptic mTSAs. Although excluded from current approaches, this extended mutational landscape, leveraging both complex rearrangements and non-coding regions, should therefore be included in the TSA search space in order to broaden their repertoire. Third and final, aeTSAs, i.e MAPs with a non-tolerogenic normal sequence, have never been fully explored as no one ever got the tools to properly select those, i.e. RNA-sequencing data from the key players in the establishment of central tolerance, MHC II<sup>hi</sup> medullary thymic epithelial cells (mTEC<sup>hi</sup>)<sup>16</sup>. In fact, Rooney M.S. *et al.* showed that, on a panel 276 cancer-testis antigens, which are by definition aeTSAs, only 60 were truly silent in normal cells, as the others were detected in normal tissues sequenced by the GTEx consortium, which lead to mixed report with regards to their antitumor effect<sup>19,20</sup>. In addition to cancer-testis antigens, another potential source for aeTSAs are endogenous retroelements (ERE), whose expression is usually repressed in normal cells<sup>21,22</sup>, and which have been shown to generate highly immunogenic MAPs shared by several tumors in both mice and humans<sup>22-24,23,25-28</sup>. Consequently, with the work presented here, we tried to answer the following questions: what is the contribution of atypical TSAs to the TSA landscape of tumors? And, are they

relevant targets for cancer immunotherapy? To this end, we first developed a proteogenomic approach using RNA-sequencing data from cancer and normal-matched mTEC<sup>hi</sup> samples in order to identify non-tolerogenic TSAs derived from (i) coding and non-coding regions of the genome, (ii) non-synonymous single-base mutations or short InDels and more complex rearrangements as well as (iii) EREs, and that would work regardless of the sample's mutational load or complexity. The contribution of such unexplored TSA sources was quantified in a murine cell lines, namely EL4 cells, revealing that most TSAs do derive from non-coding regions. Second, we demonstrated the relevance of such cryptic antigens for cancer immunotherapy by showing that prophylactic vaccination with EL4-derived TSAs followed by EL4 cell injection delayed, and even prevented, leukemia onset in mice. However, not all TSAs were equally immunodominant and differences in TSA protective effects could be ascribed to (i) the frequency of antigen-specific T cells and (ii) the clonality of the antigen on cancer cells. Because those two metrics can easily be estimated in humans, they could be used as additional criteria to improve TSA prioritization in a more clinical setting.

## 5.5 Methods

### *Mice*

C57BL/6 mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were housed under specific pathogen-free conditions and all experimental protocols were approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur des Animaux of Université de Montréal.

### *Cell lines*

The EL4 lymphoma cell line was obtained from ATCC (the American Type Culture Collection). RMA-S cells were provided by Dr. Sylvie Lesage (Université de Montréal, Montreal, Canada). All cells were cultured in RPMI 1640/HEPES supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Cell culture media were further supplemented with 1% non-essential amino acids and 1% sodium-pyruvate or 0.048 mmol.L<sup>-1</sup> β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) for EL4 and RMA-S cells, respectively. Unless stated otherwise, all reagents were purchased from Gibco.

### *Peptides*

Native versions of TSAs were synthesized by GenScript. Purity, as determined by the manufacturer, was greater than 95%.

### *mTEC<sup>hi</sup> and thymocytes extraction*

Thymi were isolated from 5-8 week-old mice and mechanically disrupted to extract thymocytes. Stromal cell enrichment was performed as previously described<sup>29</sup>. Thymic stromal cells were stained with biotinylated Ulex europaeus lectin 1 (UEA1; Vector Laboratories), PE-Cy7-conjugated streptavidin (BD Biosciences), and the following antibodies: Alexa Fluor 700 anti-CD45, PE anti-I-A<sup>b</sup> (BD Biosciences), allophycocyanin-Cy7 anti-EpCAM (BioLegend). Cell viability was assessed using 7-aminoactinomycin D (7-AAD; BD Biosciences). Live mature mTECs (mTEC<sup>hi</sup>) were gated as 7-AAD<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> UEA1<sup>+</sup> MHC II<sup>hi</sup>. mTECs<sup>hi</sup> were sorted on a three-laser FACS Aria (BD Biosciences).

### ***RNA extraction, library preparation and sequencing***

For thymocytes and EL4 cells, one replicate of  $5 \times 10^6$  cells was used to perform RNA-sequencing. For C57BL/6 mTEC<sup>hi</sup>, RNA-sequencing was performed in triplicate on a minimum of 31,686 FACS-sorted cells extracted from 2 females and 2 males. In all cases, total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen), further purified using the RNeasy kit or RNeasy micro kit (Qiagen) as recommended by each manufacturer and quantified on a Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). RNA quality was assessed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Genomics) in order to select samples with an RNA integrity number  $\geq 9$ . cDNA libraries were prepared from 2-4  $\mu\text{g}$  (thymocytes, EL4 cells) or 100 ng (mTEC<sup>hi</sup>) of total RNA using the TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit (thymocytes, EL4 cells) or KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (C57BL/6 mTEC<sup>hi</sup>). These libraries were further amplified by 9-15 cycles of PCR before sequencing. Paired-end RNA-sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2000 and yielded an average of  $186 \times 10^6$  reads per sample (see Supplementary Table 5.S1).

### ***Personalized database generation***

For all EL4 cells and C57BL/6 mTEC<sup>hi</sup>, RNA-sequencing reads were trimmed for sequencing adapters and low quality 3' bases using Trimmomatic version 0.35 and then aligned to the reference genome GRCm38.87 using STAR version 2.5.1b<sup>30</sup> running with default parameters except for `--alignSJoverhangMin`, `--alignMatesGapMax`, `--alignIntronMax`, and `--alignSJstitchMismatchNmax` parameters for which default values were replaced by 10, 200,000, 200,000 and 5 -1 5 5, respectively. Single-base mutations with a minimum alternate count setting of 5 were identified using freeBayes version 1.0.2-16-gd466dde [arXiv:1207.3907] and exported in a VCF, which was converted to an agnostic SNP file format compatible with pyGeno [https://f1000research.com/articles/5-381/v1]. Finally, transcript expression was quantified in transcripts per million (tpm) with kallisto version 0.43.1 [https://pachterlab.github.io/kallisto/about] running with default parameters. To build each sample's personalized proteome, we used pyGeno to (i) insert high-quality sample-specific single-base mutations (freeBayes quality > 20) in the reference genome, thereby creating a personalized genome, and to (ii) export sample-specific sequence(s) of known proteins generated by expressed transcripts (tpm > 0). These protein sequences were written to a fasta file that was subsequently used for MS database searches (EL4 proteome) and/or MAP

classification (EL4 and C57BL/6 mTEC<sup>hi</sup> proteome). See Supplementary figure 5.1 for a schematic.

### ***Generation of cancer, normal and RepeatMasker k-mer databases***

For EL4 cells and C57BL/6 mTEC<sup>hi</sup>, both R1 and R2 fastq files were independently downloaded. To ensure that all k-mers in a given k-mer database were on the transcript-encoding strand, we reverse-complemented R1 reads using an in-house python script, while leaving R2 reads untouched. Using jellyfish 2.2.3, we generated 33 and 24 nucleotide-long k-mer databases that were required for k-mer profiling and MAP classification, respectively. To include k-mers derived from endogenous retroelement (ERE) in our analysis, we exported the genomic positions and strand of all murine repetitive elements contained in RepeatMasker using the Table Browser of the UCSC genome browser, which includes ERE. This bed-formatted file was then submitted to the getFasta function from the BEDTools suite version 2.24.0<sup>31</sup> along with the primary genome assembly version GRCm38.87, thereby allowing us to obtain their nucleotide sequence. This fasta file was then used to generate the associated 33 nucleotide-long RepeatMasker k-mer database with jellyfish 2.2.3.

### ***k-mer profiling and generation of cancer-specific and cancer-ERE databases***

To extract 33 nucleotide-long k-mers that could give rise to TSAs, we restricted our analysis to k-mers seen at least 5 times in the EL4 k-mer databases. From those sufficiently expressed k-mers, cancer-specific and cancer-ERE k-mers were obtained by selecting k-mers that were not expressed in the relevant mTEC<sup>hi</sup> database for the former or by selecting k-mers detected in the RepeatMasker k-mer database that were overexpressed in cancer cells by at least 10-fold when compared to normal cells for the latter. The k-mer expression fold change was computed as follow:  $\log_2(\text{nk-occurrence}_{\text{cancer}}) - \log_2(\text{nk-occurrence}_{\text{normal}})$ , with nk-occurrence the normalized k-mer occurrence ( $\text{nk-occurrence} = [\text{k-mer occurrence in the sample} \times 10^6] / \text{total number of k-mers in the sample}$ ). Both of those k-mer sets were then independently assembled into contigs with the **kmer\_assembly** function (option linear assembly) of an in-house developed software called NEKTAR (<https://bitbucket.org/eaudemard/nektar>). Briefly, one k-mer is randomly selected from the submitted list to be used as a seed that is then extended from both ends with consecutive k-mers overlapping by 32 nucleotides. The linear assembly process stops when

either no k-mers can be assembled, i.e. no 32 nucleotide-overlapping k-mer can be found, or when more than one k-mer fits. If so, a new seed is selected and the assembly process resumes until all k-mers from the submitted list have been used once. To obtain proteins, we 3-frame translated all contigs of at least 34 nucleotide-long using an in-house python script. Cancer-specific and cancer-ERE translation products were then split at internal stop codons and any resulting subsequence of at least 8 amino acid-long was given a unique id before being included in the relevant database. To obtain the augmented cancer database, both fasta files were then concatenated with the relevant personalized proteome (see Section Personalized database generation) and subsequently used for MS database searches.

### ***MAPs isolation and mass spectrometry analysis***

Three biological replicates of  $250 \times 10^6$  exponentially growing cells were prepared for EL4 cells. MAPs were obtained as previously described<sup>32</sup>, with minor modifications: following mild acid elution, peptides were desalted on an Oasis HLB cartridge (30 mg, Waters) and filtered on a 3 kDa molecular weight cut-off (Amicon Ultra-4, Millipore) to remove  $\beta$ 2m proteins. After being dried using a Speed-Vac, peptides were resuspended in 0.2 % formic acid, loaded on a home-made C<sub>18</sub> pre-column (5 mm x 360  $\mu$ m i.d. packed with C<sub>18</sub> Jupiter Phenomenex) and separated on a home-made C<sub>18</sub> analytical column (15 cm x 150  $\mu$ m i.d. packed with C<sub>18</sub> Jupiter Phenomenex) with a 56-min gradient from 0–40 % acetonitrile (0.2 % formic acid) and a 600 nl.min<sup>-1</sup> flow rate on a nEasy-LC II system connected to a Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific). Each full MS spectrum acquired with a 70,000 resolution was followed by 12 MS/MS spectra, where the 12 most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing with a resolution of 17,500, an automatic gain control target of  $1 \times 10^6$ , an injection time of 50 ms and a collision energy of 25 %. Peptides were identified using Peaks 8.0 (Bioinformatics Solution Inc.) and peptide sequences were blasted against the sample's personalized proteome alone or concatenated with the cancer-specific and –ERE databases. For peptide identification, tolerance was set at 10 ppm and 0.01 Da for precursor and fragment ions, respectively. Occurrence of oxidation (M) and deamidation (NQ) were considered as post-translational modifications.



### ***Identification and classification of MAPs***

To select for MAPs, lists of unique identifications obtained from Peaks were filtered to include 8 to 11 amino acid-long peptides that had a percentile rank  $\leq 2\%$  as predicted by NetMHC 4.0<sup>33</sup> for at least one on the relevant MHC I molecules. Moreover, a local 5 % false discovery rate (FDR), defined as the number of decoy identifications divided by the number of target identifications above a given Peaks score threshold, was applied in order to limit the number of false positive identifications in the final peptide lists. For each pair of MAP / protein id, we retrieved the associated MCS and used this information to determine which MAP could be considered a potential TSA. Briefly, we queried each MAP in the cancer and normal personalized proteome and their associated MCS in the cancer and normal 24 nucleotide-long k-mer database, respectively. First, we inferred that MAPs seen in the normal personalized proteome were of no interest to us as they were likely to be WT MAPs, i.e. tolerized MAPs. The remaining MAPs were queried in the cancer personalized proteome to distinguish potential conventional TSAs from cryptic ones, that would be detected or not, respectively. As no protein evidence could support the TSA status of cryptic antigens, we decided to compare their MCS expression in both the cancer and normal k-mer database. MAPs associated to MCS absent from the normal sample were safely classified as TSAs. For MCS detected in the normal sample, we required a 10-fold overexpression of this MCS in cancer to classify the associated MAP as TSA rather than WT. Finally, for MAPs found in several protein ids, we decided to consider them as TSAs only if all their protein ids gave a TSA status, otherwise they were considered as WT. MAPs unambiguously labelled as TSAs were further validated at the genomic level, by getting all the RNA-sequencing reads encoding them and blasting them to obtain a genomic location that was then inspected using IGV<sup>34</sup>, and at the proteomic level, by manually inspecting their MS/MS spectrum and/or confirming their identity with synthetic peptides.

### ***Absolute quantification and validation of EL4-derived TSAs***

To validate the sequence of TSAs, we eluted MAPs from six additional EL4 replicates (~500 to 900 x 10<sup>6</sup> cells per replicate), which were all processed as previously described (see Section MAPs isolation and mass spectrometry analysis). For sequence validation, MS/MS spectrum of synthetic <sup>12</sup>C TSA (see Section Peptides) were acquired prior to sample analysis by Parallel

Reaction Monitoring (PRM) MS. Briefly, the PRM acquisition, which monitored 5 peptides as scheduled (each peptide is only monitored in a 10-minute window centered on its elution time), consisted of one MS1 scan followed by the targeted MS/MS scans in HCD mode. Automatic gain controls and injection times for the survey scan and the tandem mass spectra were  $3 \times 10^6$  – 50 ms and  $2 \times 10^5$  – 100 ms, respectively. In all cases, Skyline<sup>35</sup> was used to extract the endogenous MS/MS spectrum of each TSA and compare it to the relevant synthetic <sup>12</sup>C MS/MS spectrum

### ***Expression of EL4-derived TSAs' MCS in EL4 cells, normal tissues and primary cells.***

Leveraging RNA-sequencing data from the ENCODE consortium<sup>36</sup>, the Expression Atlas<sup>37</sup> as well as published<sup>38-42</sup> and unpublished data from our laboratory, we downloaded fastq files from 27 tissues and 16 primary cells (**Fig. 5.2a**) that were submitted to jellyfish 2.2.3 in order to obtain databases of 24 nucleotide-long k-mers. Those were used to query the MCS of EL4-derived TSAs. MCS longer than 24 nucleotides were chopped into 24 nucleotide-long k-mers that were independently queried in those databases. MCS detection was considered positive only when all MCS-derived k-mers were detected in a given sample and the average MCS count was returned (MCS<sub>count</sub>). For each sample, the normalized MCS count (MCS<sub>norm</sub>) was computed as follow:  $MCS_{norm} = (MCS_{count} \times 10^6) / N_k$ , with  $N_k$ , total number of k-mers in the considered sample and results are presented in Figure 2b and c. The same procedure was applied to compute the normalized expression of EL4-derived TSAs' MCS in EL4 cells presented in Figure 5.5a.

### ***Generation of bone marrow-derived dendritic cells (DCs), mouse immunization and EL4 cell injection***

Bone marrow-derived DCs were generated as previously described<sup>4,43</sup>. For mouse immunization, DCs from male C57BL/6 mice were pulsed with 2  $\mu$ M of the selected peptide for 3 hours, then washed. 8- to 12-week old female C57BL/6 mice were injected i.v. with  $10^6$  *individually* peptide-pulsed DCs at day -14 and -7, or with irradiated EL4 cells (10,000 cGy). As negative control, C57BL/6 female mice were immunized with unpulsed DCs. For EL4 cell injection, mice were injected i.v. on day 0 with  $5 \times 10^5$  cells and were monitored for loss of weight, paralysis, or tumor outgrowth.

### ***ELISpot and avidity assays***

ELISpot and avidity assays were performed as previously described<sup>4</sup>. Briefly, Millipore MultiScreen PVDF plates were permeabilized with 35% ethanol, washed, and coated overnight using the Mouse IFN- $\gamma$  ELISpot Ready-SET-Go! reagent set (eBioscience). At day 0 following mice immunization, splenocytes were harvested from immunized or naive mice.  $30 \times 10^6$  splenocyte.mL<sup>-1</sup> were stained with FITC-conjugated anti-CD8 $\alpha$  (BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C, washed, and sorted using a three-laser FACS Aria apparatus (BD Biosciences). Sorted CD8 T cells were plated and incubated at 37°C for 48 hours in the presence of irradiated splenocytes (4,000 cGy) from syngeneic mice pulsed with the relevant peptide (4  $\mu$ M for the ELISpot assay and  $10^{-4}$  to  $10^{-14}$  M for the avidity assay). As a negative control, CD8 T cells from naive mice were incubated with peptide-pulsed splenocytes. Spots were revealed using the reagent set manufacturer protocol and were enumerated using an ImmunoSpot S5 UV Analyzer (Cellular Technology Ltd). IFN- $\gamma$  production was expressed as the number of spot-forming units per  $10^6$  CD8 T cells and the EC<sub>50</sub> was calculated using a dose-response curve.

### ***Cell isolation from lymphoid tissue and tetramer-based enrichment protocol***

The spleen and inguinal, axillary, brachial, cervical and mesenteric lymph nodes were harvested from C57BL/6 mice. Single-cell suspensions were stained with Fc block and 10 nM of PE- or APC-labeled pMHC I tetramers (NIH Tetramer Core Facility) for 30 minutes at 4°C. After washing with ice-cold sorting buffer (PBS with 2% FBS), cells were resuspended in 200  $\mu$ L of sorting buffer and 50  $\mu$ L of anti-PE and/or anti-APC antibody conjugated magnetic microbeads (Miltenyi Biotech), then incubated for 20 minutes at 4°C. Cells were then washed and tetramer<sup>+</sup> cells were magnetically enriched as previously described<sup>44,45</sup>. The resulting tetramer<sup>+</sup>-enriched fractions were stained with APC Fire 750-conjugated anti-B220, F4/80, CD19, CD11b, CD11c (BioLegend), PerCP-conjugated anti-CD4 (BioLegend), BV421-conjugated anti-CD3 (BD Biosciences), BB515-conjugated anti-CD8 (BD Biosciences), BV510-conjugated anti-CD44 (BD Biosciences) antibodies and Zombie NIR Fixable Viability Kit (BioLegend). Anti-CD11b and CD11c were left out for the analysis of post-immunization repertoires because these markers may be expressed by some activated T cells<sup>46,47</sup>. The entire stained sample was then analyzed on a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences) and fluorescent counting beads (Thermo Fisher Scientific) were used to normalized the results. As negative control, we enriched the antigen-

specific CD8 T-cell repertoires targeting 3 virus-derived antigens: gp-33 from the lymphocytic choriomeningitis virus protein gp-33 (KAVYNFATC; H-2D<sup>b</sup>), M45 from the murine cytomegalovirus protein M45 (HGIRNASFI; H-2D<sup>b</sup>) and B8R from the vaccinia virus protein B8R (TSYKFESV; H-2K<sup>b</sup>).

### ***Quantification of MHC I expression***

10<sup>6</sup> freshly harvested C57BL/6 thymocytes (see Section mTEC<sup>hi</sup> and thymocytes extraction) or exponentially growing EL4 cells were stained with either a PE-conjugated pan-H-2 antibody (BioLegend) or a PE-conjugated Rat IgG2a, isotype control (BD Biosciences), washed and acquired on a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences).

### ***MHC binding affinity***

Evaluation of peptide binding affinity to MHC I molecules was performed as previously described<sup>4</sup>. Briefly, the RMA-S cells were used for their temperature sensitive expression of empty MHC I molecules. Peptide binding to H-2D<sup>b</sup> and H-2K<sup>b</sup>, was assessed by incubating RMA-S cells overnight at 26°C with 10<sup>-4</sup> M of the selected peptide. Cells were transferred at 37°C for 2 hours, washed, stained with antibodies against H-2K<sup>b</sup> or H-2D<sup>b</sup> (purified anti-H-2D<sup>b</sup> antibody from Cedarlane, secondary anti-IgG2a-PE, APC-conjugated anti-H-2K<sup>b</sup> and isotypes from BD Biosciences) and acquired on a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences).

### ***Data availability***

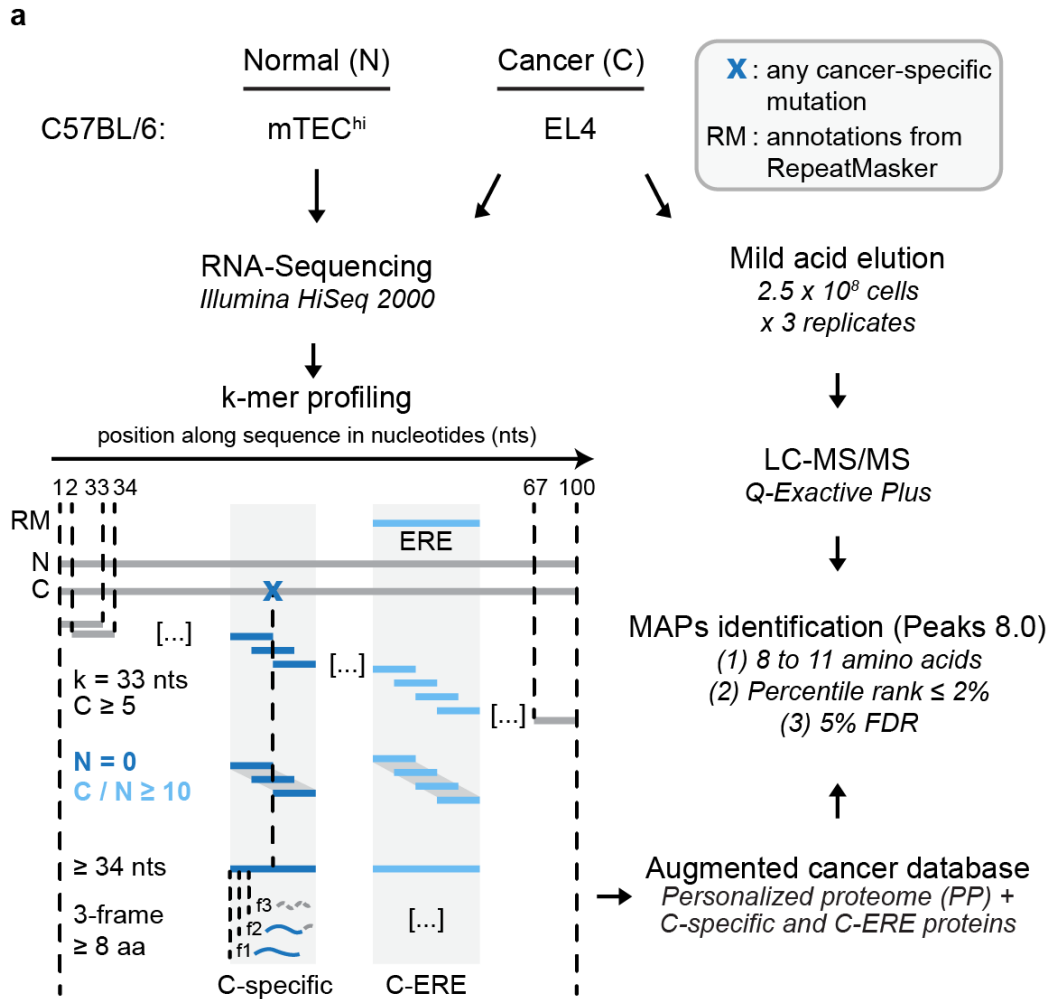
All sequencing data will be deposited in the NCBI BioProject database and MS raw data and associated databases will be deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository. Finally, lists of MAPs will be deposited to the Immune Epitope Database (IEDB).

## 5.6 Results

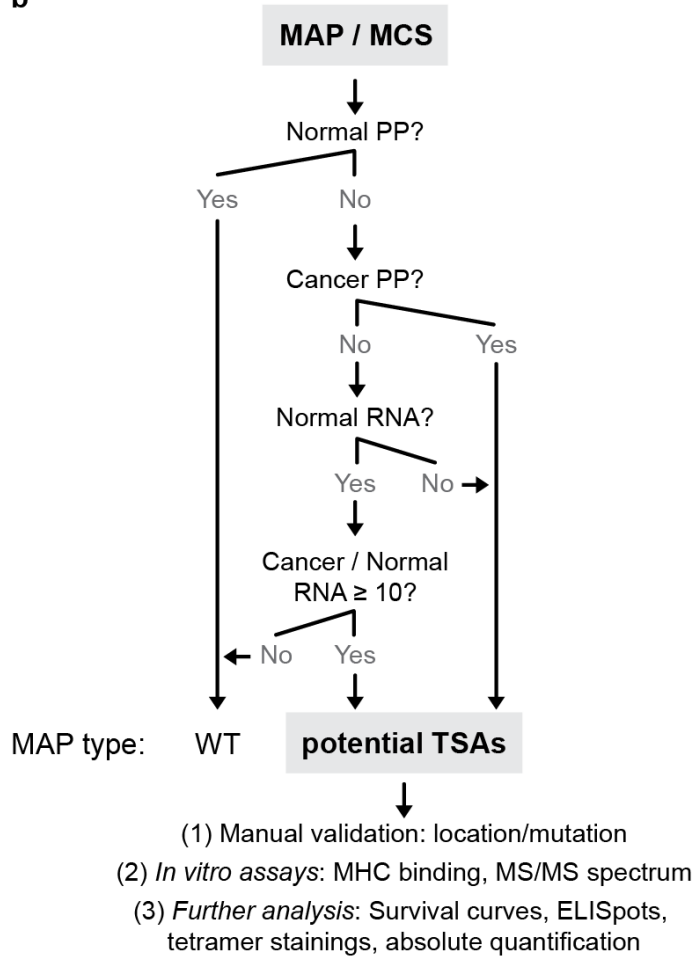
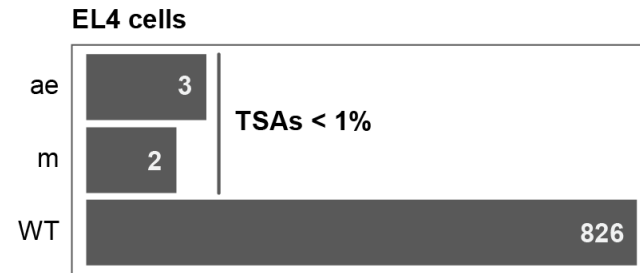
### 5.6.1 When ‘less is more’ - building smaller MS databases to identify more TSAs.

We previously developed a high-throughput proteogenomic method to identify both cryptic and conventional MAPs by naively 6-frame translating RNA-sequencing reads and using this as a database for mass spectrometry (MS)<sup>18</sup>. Although unbiased, such approach did not scale well with the increased sequencing depth required for TSA identification as it lead to the generation of extremely large databases (up to 5Gb) in which about 80% of sequences were expected to be false (~5 out of the 6 possible reading frames). Submitting such database to typical MS identification software, such as Peaks, along with the relevant immunopeptidomic data yielded fewer identifications than the same search performed with the reference proteome and this, regardless of the false discovery rate (FDR) threshold applied (**data not shown**). This counterintuitive observation can be explained by the fact that a larger database, containing mostly false sequences, increases the chances of having high-confidence, yet incorrect, peptide-spectrum matches, thereby leading to a gross FDR overestimation<sup>48-50</sup>. Accordingly, as pointed out by Noble, “mass spectrometrists should search only for peptides they care about”<sup>49</sup>. Hence, we needed to build a smaller and truer database that would still contain all required information, namely both aberrantly expressed and mutated MCS, to fully characterize the TSA landscape of any given tumor.

To this end, we first used liquid chromatography-MS/MS to analyze MAPs eluted from EL4 cells, a murine cancer cell lines of C57BL/6 origin that is well characterized. In order to build a sample-specific composite database, that we will refer to as the ‘augmented cancer database’, we then analyzed RNA-sequencing data from those two cancer samples, along with those from a normal-matched sample (**Fig. 5.1a**).



**Figure 5.1. Identification of tumor-specific antigens from unexplored sources using a novel targeted proteogenomic workflow.** (a) Schematic presenting the proteogenomic workflow used to identify tumor-specific antigens (TSAs) from unexplored sources presented by EL4 cells. In both cases, MHC I-associated peptides (MAPs) were eluted from the cell surface and sequenced by liquid chromatography-MS/MS (LC-MS/MS). To determine MAPs' amino acid (aa) sequence, we developed a k-mer profiling strategy to isolate, from cancer RNA-sequencing data, cancer-specific (in dark blue) and cancer-ERE (in light blue) sequences that were unlikely to be tolerized, i.e. absent from or strongly downregulated in mTEC<sup>hi</sup>. The *in silico* translation of those sequences was then concatenated to the cancer's personalized proteome (PP, Supplementary Fig.S1a) in order to build the augmented cancer database that was used as a database to analyze MS data. All excluded sequences are depicted in grey.

**b****c**

**Figure 5.1. Continued. Identification of tumor-specific antigens from unexplored sources using a novel targeted proteogenomic workflow.** (b) Decision grid used to classify MAPs as wild-type (WT) or potential TSAs based on their peptide and MAP-coding sequence (MCS) detection in the normal vs. cancer PP or RNA-sequencing data, respectively. In all cases, a positive detection was defined by an occurrence  $\geq 1$  in the relevant dataset. (c, d) TSAs of all types are very rare events in analyzed tumors. Barplot showing the number of WT MAPs and TSAs, classified according to their type (c).

The first portion of this composite database is a classic cancer personalized proteome, which was obtained by simply integrating the sample's high quality single-base mutations in the reference genome, from which we derived the in-frame translation of all expressed protein-coding transcripts (**Supplementary Fig. 5.1a**). This database-building strategy is very similar to what has been previously done<sup>9,51</sup> and, taken alone, can only identify conventional MAPs, that is, WT MAPs and mTSAs coded by the canonical frame of the exome. The second portion of this composite database aimed at capturing proteins that could potentially generate the TSAs coded by any reading frame of all genomic regions. To do so, rather than using heuristics that might miss some complex cancer-specific mutations, we developed an alignment-free approach, called k-mer profiling, that should capture the full landscape of cancer-specific sequences. To ensure the selection of non-tolerogenic sequences, we chose to use RNA-sequencing data from mTEC<sup>hi</sup> as a normal-matched sample. We selected mTEC<sup>hi</sup> because i) via their unique promiscuous gene expression profile they express the entire protein-coding sequences of somatic cells and ii) MAPs expressed in mTECs induce central immune tolerance. With this in hand, we applied our k-mer profiling strategy by first chopping normal-matched and cancer RNA-sequencing reads into k-mers, which are (in our case) all possible 33-base-pair long subsequences because the majority of MAPs are 8 to 11 amino-acid long, i.e. encoded by 24 to 33-base-pair-long sequences. Then, to exclude potential sequencing errors, we kept only cancer cell k-mers seen at least at five times and compared them to the normal-matched k-mer pool in order to extract (i) cancer-specific k-mers and (ii) overexpressed cancer-ERE k-mers. The selection of cancer-specific cancers was straightforward because, in the k-mer space, identical sequences necessarily yield identical k-mer sets, while unique sequences or sequences differing by at least one base pair yield new k-mers, i.e. k-mers overlapping the unique or mutated region. Consequently, k-mers solely detected in the cancer sample were considered as cancer-specific. The selection of overexpressed cancer-ERE k-mers followed slightly different rules. Indeed, we included in this dataset all cancer k-mers seen in RepeatMasker (to ensure their potential ERE origin), that were overexpressed by at least 10-fold in cancer cells relative to mTEC<sup>hi</sup>. The rationale for this slightly more lenient attitude toward ERE k-mers is two-fold. First, considering that mammalian genomes contain multiple copies of ERE, located in different genomic regions, and that biogenesis of MAPs depend on the genomic context<sup>10</sup>, an ERE k-mer may generate MAPs in one context (cancer cells) but not the other (mTEC<sup>hi</sup>). Second, since MAPs originate



primarily from transcripts expressed at high levels<sup>10,52</sup>, a k-mer whose expression is barely detectable in mTEC will probably generate MAPs only in cancer cells. Finally, to remove the redundancy inherent to the k-mer space, we independently collapsed those 2 k-mer sets into longer sequences, called contigs, and further 3-frame translated them to yield the cancer-specific and cancer-ERE protein sets, respectively. As a whole, our k-mer strategy can be considered as a targeted strategy, since it only captures and further reconstructs the non-tolerogenic portions of the cancer transcriptome, whether they are caused by cancer-specific mutations or overexpression events. The k-mer strategy enabled the construction of what we heretofore refer to as “cancer augmented databases”. These databases possess two critical features: i) they have a limited size: ~300Mb vs. up to 5Gb for databases obtained following the 6-frame translation of all RNA-sequencing reads, and ii) in addition to the classical exomic proteome, they contain all potentially immunogenic TSAs.

Applied to EL4 cells, our k-mer profiling strategy extracted, assembled and 3-frame translated ~12% of the initial cancer k-mer pool, with the mTEC<sup>hi</sup> filtering step removing ~80% of expressed k-mers (**Supplementary Fig. 5.1b**). At a 5% FDR threshold, the EL4 augmented cancer database identified a total of 769 MAPs. To determine which of those MAPs were potential TSAs, we retrieved their MCS and applied the following classification strategy (**Fig. 5.1b**): MAPs seen in the normal-matched mTEC<sup>hi</sup> personalized proteome (**Supplementary Fig. 5.1a**), along with MAPs encoded by ERE that were not overexpressed by at least 10-fold in cancer cells were classified as WT MAPs. Other MAPs were classified as potential TSAs and further validated manually and *in vitro* before being tested *in vivo*. As expected, TSAs were very rare, as they represented less than 1% of the total MAP repertoire, and belonged to both the aberrantly expressed and the mutated category (**Fig. 5.1c** and **Table 5.1**). All those TSAs were predicted to be good MHC binders (**Supplementary Fig. 5.2a**), binding that was further validated for EL4-derived TSAs as they stabilized the relevant MHC I molecule when loaded onto RMA-S cells (**Supplementary Fig. 5.2b**). Moreover, MS/MS spectra of EL4-derived (**Supplementary Fig. 5.3**) TSAs were all confirmed by MS using synthetic analogs. Interestingly, all EL4-derived aeTSAs and mTSAs were of cryptic origin. Indeed, we identified 2 TSAs that derived ERE sequences, as well as 3 TSAs that derived from intergenic (2) or intronic (1) regions of non-ERE origin, referred to as “self (s)” sequences. Most importantly,

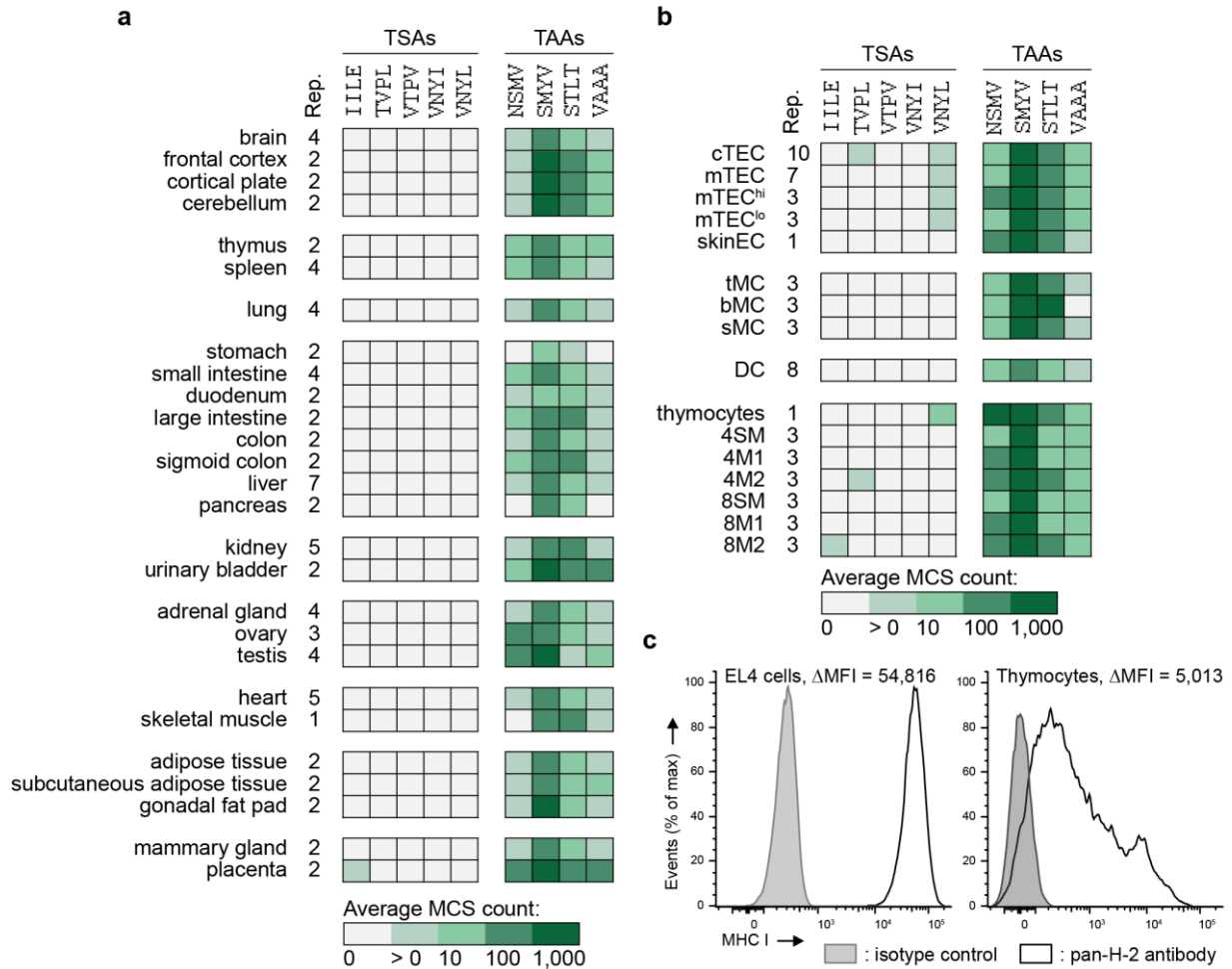
these antigens would have been missed by proteogenomic approaches considering only the whole exome. Among the identified mTSAs, one was generated by a single-base mutation located in an MMTV, while the other resulted from the translation of a fusion transcript resulting from an intergenic deletion of ~7,500 base pairs (**Table 5.1**), thereby demonstrating that our targeted k-mer profiling workflow is able to reconstruct sequences derived from complex mutations. Altogether these observations highlight that, although overlooked, cryptic and complex-rearrangement-derived antigens represent a sizeable proportion of the TSA repertoire.

Finally, we leveraged RNA-sequencing data from 27 tissues and 16 types of primary cells, all obtained from C57BL/6 mice (**Supplementary Fig. 5.4**), in order to (i) evaluate the robustness of our mTEC<sup>hi</sup> filtering and (ii) gain some insight with regards to the antileukemic potential of our 5 EL4-derived cryptic TSAs. To do so, we quantified, in those samples, the MCS expression of our 5 TSAs as well as four TAAs (**Fig. 5.2a, b**), which are known to be presented by EL4 cells<sup>53</sup> and are unable to trigger protective antileukemic responses<sup>4</sup>. As opposed to the broad expression pattern of TAAs' MCS, our TSAs showed a highly restricted expression pattern. Unsurprisingly, our two mTSAs' MCS, VTPVYQHL and VNYIHRNV, were not detected in any of the tested normal samples, as they derived from EL4-specific mutations. Moreover, our three aeTSAs, derived from silent sequences in mTEC<sup>hi</sup>, were detected in very few peripheral tissues with an MCS expression below 5. The only exception to this rule was the MCS of VNYLHRNV, our ae-ereTSA, which was detected in normal thymocytes with a count of 81. Although this expression level might theoretically be sufficient for MAP generation, we showed that thymocytes express ~10-fold less MHC I molecules than EL4 cells (**Fig. 5.2c**), thereby confirming that thymocytes do not present it. Altogether these observations clearly demonstrate that our mTEC<sup>hi</sup> filtering of cancer RNA-sequencing is a very good proxy for peripheral antigen expression.

**Table 5.1. Characteristics of EL4-derived TSAs identified by our k-mer-based proteogenomic approach.**

Peptide Sequence	Peptide Length (aa)	MHC I Molecule	Percentile Rank	Peptide Class	Genomic Position	Strand	Mutation Type	Sequence biotype	Orientation	Peaks Score
<b>IILEFHSL</b>	8	H-2K <sup>b</sup>	0.02	ae-sTSA	chr10:116678525-116678548	+	None	Intergenic	NA	
<b>TVPLNHNTL</b>	9	H-2D <sup>b</sup>	0.12	ae-sTSA	chr4: 83615597-83615624	-	None	Intronic	Antisense	
<b>VNYIHRNV</b>	8	H-2K <sup>b</sup>	0.01	m-ereTSA	chr4:46583174-46583197	+	Single-base	MMTV	Sense	
<b>VNYLHRNV</b>	8	H-2K <sup>b</sup>	0.01	ae-ereTSA	chr4:46583174-46583197	+	None	MMTV	Sense	
<b>VTPVYQ   HL</b>	8	H-2K <sup>b</sup>	0.01	m-sTSA	chr2:75078751-75078756   chr2:75086270-75086287	-	Large deletion	Intergenic	NA	

aa: amino acids, ae-s/ereTSA: aberrantly expressed self- or endogenous retroelement-derived TSA, m-s/ereTSA: mutated self- or endogenous retroelement-derived TSA, MMTV: mouse mammary tumor virus, MuLV: murine leukemia virus. The reported binding score is the lowest one obtained using NetMHC 4.0 for the relevant MHC I molecules. The sequence biotype refers to the biotype of the overlapping annotated feature and is set to intergenic when none exists. The orientation is defined with regards to overlapping annotated feature and is set to NA when none exists.



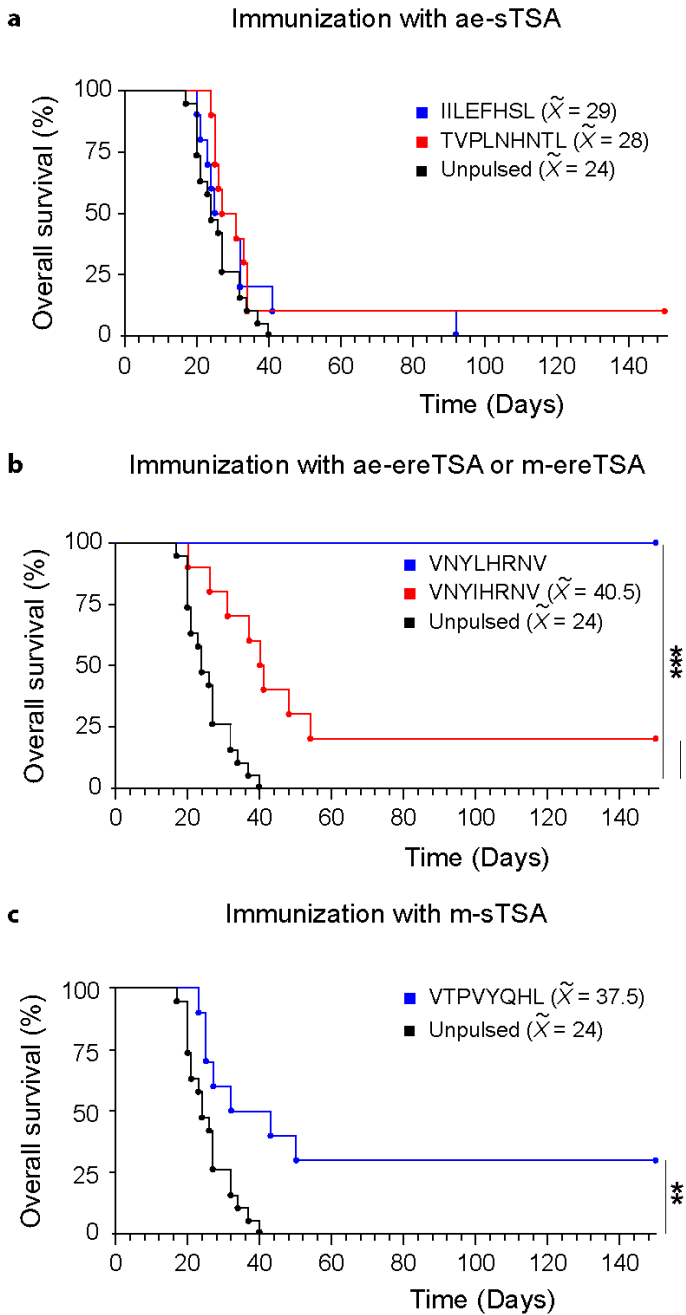
**Figure 5.2. EL4-derived TSAs are unlikely to be centrally tolerated.** (a, b) ae-TSAs are lowly expressed in very few peripheral samples. Heat-map showing the normalized MCS count for our five EL4-derived TSAs as well as our four TAAs in 27 peripheral mouse tissues (a) and 16 types of primary cells sequenced (b). For each sample, the number of replicates (Rep.) performed are indicated right next to the sample name. (c) Histogram showing the surface MHC I expression of EL4 cells (left) and freshly harvested thymocytes (right). The  $\Delta\text{MFI}$  specified at the top of each graph corresponds to the MFI obtained following staining with the pan-H-2 antibody minus the MFI obtained following staining with the proper isotype control.

## 5.6.2 Identified TSAs confer different degree of protective antileukemic responses.

In order to determine whether our TSAs were able to elicit protective anti-tumor responses, we immunized mice with peptide-pulsed or unpulsed DCs, then injected them with EL4 cells and monitored signs of disease for 150 days. In the control group, i.e. immunization

with unpulsed dendritic cells (DCs), mice showed rapid signs and progression of disease, the first death occurring at day 17 post-injection while the last occurred at day 40, with a median survival of 24 days. Similarly, priming against ae-sTSAs individually, i.e. IILEFHSL or TVPLNHNTL, did not improve overall survival or time to disease onset, with median survival of 28 and 29 days, respectively. Interestingly, one mice immunized against IILEFHSL survived up to day 92 and one mice immunized against TVPLNHNTL survived up to day 150, indicating that some level of disease control did occur in these mice (**Fig. 5.3a**). In contrast, mice immunized individually against the m-ereTSA VNYIHRNV or the m-sTSA VTPVYQHL showed a significant delay in disease onset compared to mice immunized with unpulsed DCs, with a median survival of 40.5 and 37.5 days, respectively. Moreover, we saw an improvement in overall survival for mice immunized against these antigens, with a 20% survival for the VNYIHRNV immunization and 30% for the VTPVYQHL immunization. Impressively, 100% of the mice immunized against the ae-ereTSA VNYLHRNV remained disease-free after 150 days (**Fig. 5.3b, c**).

Several points can be made from our results. First, our results show that protective antileukemic responses can be achieved by VNYLHRNV, VTPVYQHL and VNYIHRNV and to some level by TVPLNHNTL and IILEFHSL. Nevertheless, the five TSAs showed dramatic differences in their ability to elicit protective antileukemic responses. Second, even though VNYLHRNV and VNYIHRNV represent variants peptides of the same epitope, we observed major differences in overall survival when mice were immunized against each antigen individually (100% and 20% respectively, **Fig. 5.3b**). In order to get a mechanistic understanding of inter-TSA discrepancies, we next analyzed features of our TSAs as well as the frequency of TSA-responsive T cells in naïve and immunized mice.



**Figure 5.3. Pre-immunization with mutated and ereTSAs delays disease onset and limits leukemia outgrowth.**

C57BL/6 female mice were immunized twice with peptide-pulsed male-derived DCs as follows: (a) ae-sTSAs, (b) ere-s or ere-mTSAs and (c) m-sTSAs. Mice were injected with EL4 cells at day 0 and all surviving mice were rechallenged at day 150 and monitored for 50 days. Injection of  $5 \times 10^5$  EL4 cells i.v. is depicted by black triangles. Control groups were immunized with unpulsed DCs (black line).  $\tilde{X}$  represents the median survival. Statistical significance of immunized vs. control groups was calculated using a log-rank test, where \*\*  $P \leq 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ . 10 mice per group for peptide-specific immunization, 19 mice for control group.

**5.6.3 T cells specific to ereTSAs are abundant in naive and immunized mice.**

We previously demonstrated that the frequency and functional avidity of antigen-specific T cells are strong predictors of antileukemic potential<sup>4</sup>. Thus, we first investigated the frequency of

antigen-specific T cells for the 5 identified TSAs (**Table 5.1**) in the naive repertoire and in immunized mice using a tetramer-based enrichment protocol<sup>44,45</sup> and the gating strategy described in Supplementary Fig. 5.5a. As positive internal controls, we analyzed CD8 T cells specific for three viral epitopes (gp-33, M45 and B8R) because they have been reported to be particularly abundant in C57BL/6 mice<sup>54</sup>.

Consistent with data from the literature, we found a high precursor frequency of CD8 T cells specific for gp-33, M45 and B8R in naive mice, with a mean of 15, 24 and 53 tetramer<sup>+</sup> cells per 10<sup>6</sup> CD8 T cells (**Fig. 5.4a - left side** and **Supplementary Fig. 5.5b**). The key finding was that, in naive mice, T cells specific for our two ereTSAs (VNYIHRNV and VNYLHRNV) displayed frequencies similar to those observed for our positive controls. However, the size of the CD8 T cell repertoires for the 3 other TSAs was significantly smaller, with less than one tetramer<sup>+</sup> cell per 10<sup>6</sup> CD8 T cells (**Fig. 5.4a - right side** and **Supplementary Fig. 5.5c**).

We next immunized mice against individual EL4 TSAs and viral peptides. Comparison of the CD8 T-cell repertoire frequency post-immunization to that of the naive repertoire revealed a more than 128-fold and 186-fold enrichment in the abundance of tetramer<sup>+</sup> cells specific for VNYIHRNV and VNYLHRNV, respectively (**Fig. 5.4b - right side** and **Supplementary Fig. 5.6a**). These enrichment in antigen-specific CD8 T-cell populations were in the range of those observed for mice immunized against the 3 viral peptides, which showed 17-fold, 310-fold and 102-fold enrichment for gp-33, M45 and B8R, respectively (**Fig. 5.4b - left side** and **Supplementary Fig. 5.6a**). Moreover, we found a near-absent amplification of the antigen-specific CD8 T-cell repertoire for mice immunized against VTPVYQHL, TVPLNHNTL or IILEFHSL, with a 0.7-fold, 2.1-fold and 3-fold enrichment, respectively (**Fig. 5.4b - right side** and **Supplementary Fig. 5.6a**). The frequency of antigen-specific T cells in naive and immunized mice were highly correlated (**Supplementary Fig. 5.7a**), further confirming previous reports demonstrating that the frequency of antigen-specific CD8 T cells in the naive repertoire influences the degree of enrichment after immunization<sup>44,55-57</sup>. One intriguing observation was that, at seven days post-immunization, we were unable to detect an amplification of CD8 T cells specific for VTPVYQHL (**Fig. 5.4b**), despite a 30% overall survival after challenge with EL4 cells (**Fig. 5.3c**). Nonetheless, these antigen-specific CD8 T

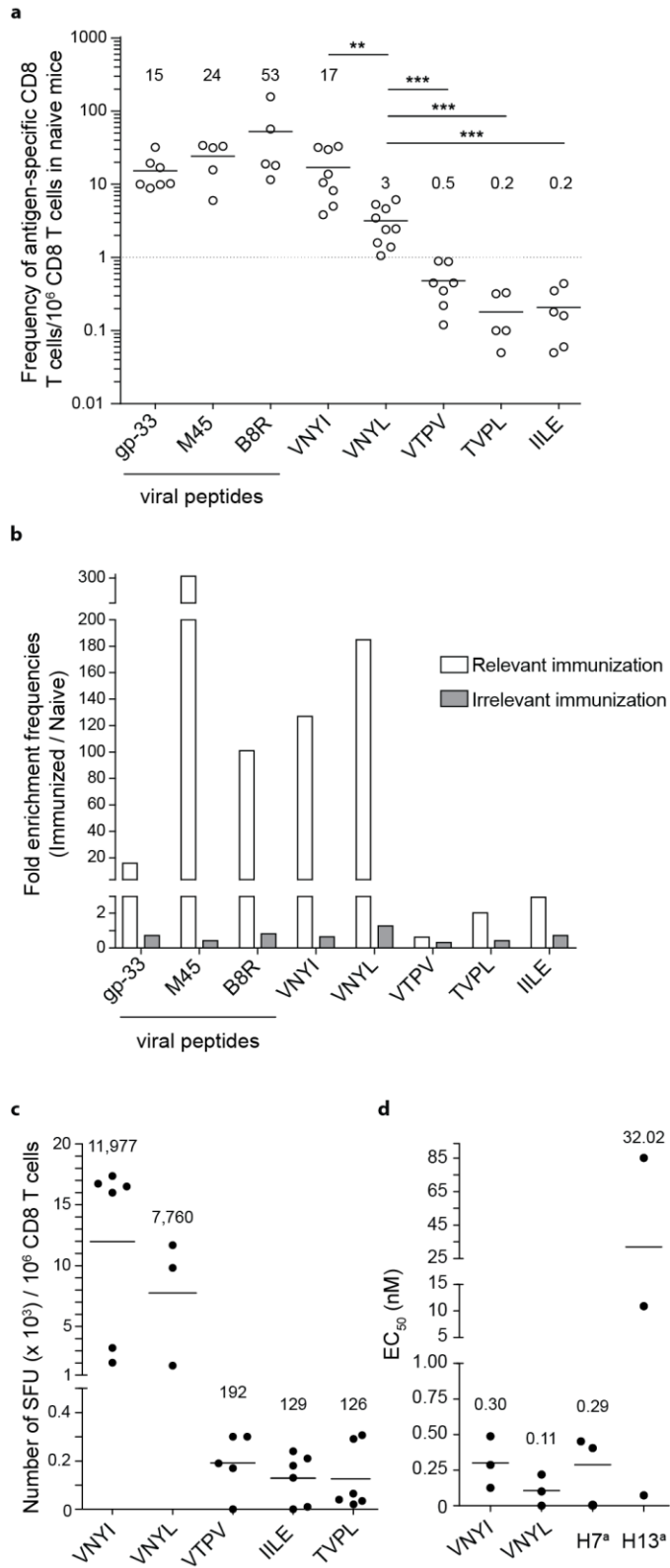
cells, as were those specific for other TSAs, had a CD44<sup>+</sup> phenotype, which mostly reflects antigen experienced T cells<sup>58</sup> (**Supplementary Fig. 5.5b, c**).

It is well known that pMHC tetramers preferentially bind to high affinity antigen-specific CD8 T cells and that this method of quantification does not reflect their *in vitro* nor *in vivo* functionality<sup>59</sup>. Thus, to further understand the dynamics of the antigen-specific CD8 T-cell repertoire after immunization, we next performed IFN- $\gamma$  ELISpot assays on FACS-sorted CD8 T cells to evaluate the frequency of reactive antigen-specific T cells. We found that the abundance of spot forming units per 10<sup>6</sup> CD8 T cells was significantly higher for VNYIHRNV and VNYLHRNV (11,977 and 7,760 respectively) than for VTPVYQHL, IILEFHSL or TVPLNHNTL (192, 129 and 126 respectively) (**Fig. 5.4c**). Moreover, the abundance of antigen-specific reactive T cells was highly correlated to the frequency of antigen-specific T cells in both the naive and immunized repertoire, as calculated using the tetramer-based enrichment protocol (**Supplementary Fig. 5.7b, c**).

Next, we calculated the functional avidity of our antigen-specific CD8 T cells, by measuring the concentrations of exogenous peptide needed to activate T cells. We thus calculated the EC<sub>50</sub> of FACS-sorted CD8 T cells from immunized mice by exposing them to a range of exogenous peptide concentration in an IFN- $\gamma$  ELISpot assay<sup>5,60</sup>. We were only able to calculate the functional avidity of high frequency T cells, i.e. those specific for VNYIHRNV and VNYLHRNV (**Fig. 5.4b, c**).

We found that those antigen-specific T cells were activated when exposed to low concentration of antigens (EC<sub>50</sub> of 0.30 and 0.11 nM respectively). Their functional avidity was similar to that of the immunodominant minor histocompatibility antigen H7<sup>a</sup> (0.28 nM) and superior to that of the sub-dominant H13<sup>a</sup> minor histocompatibility antigen (32.02 nM)<sup>4</sup> (**Fig. 5.4d**). Nonetheless, the determinants of immunodominance for our TSAs must involve other parameters, as functional avidity for VNYIHRNV and H7<sup>a</sup> were similar, while their respective antigen-specific CD8 T cells conferred a 20% vs. 100% overall survival<sup>4</sup> (**Fig. 5.3b**).





**Figure 5.4. T cells specific for ereTSAs are more frequent in the naive and immunized repertoire and are more competent than other TSA-specific T cells.** (a) *Ex vivo* frequencies of pMHC I tetramers<sup>+</sup> CD8 T cells in naive mice are represented as number of antigen-specific CD8 T cells per  $10^6$  CD8 T cell. Each circle represents one mouse. Dotted line represents the threshold of frequency already described with this technique. (b) Amplification of antigen-specific CD8 T cells after immunization. Fold enrichment for pMHC I tetramers<sup>+</sup> CD8 T cells was calculated by dividing the mean frequency in immunized mice by the mean frequency in naive mice. Data express the fold enrichment for antigen-specific CD8 T cells in mice immunized with relevant (white bars) or irrelevant peptide (gray bars). (c, d) Sorted CD8 T cells from immunized mice were incubated for 48 hours in the presence of irradiated peptide-pulsed splenocytes. (c) The frequency of IFN- $\gamma$  secreting antigen-specific cells is expressed as the mean frequency of SFC in immunized mice minus that of naive mice per  $10^6$  CD8 T cells plated. Each circle represents one replicate. (d) Functional avidity of antigen-specific T cells was calculated by normalizing the frequency of SFC to maximum value and by calculating an  $EC_{50}$  for each peptide using a dose-response curve. Functional avidity values for H7<sup>a</sup> and H13<sup>a</sup> were previously published and used for comparative purposes. Three independent experiments

unless stated otherwise. Full horizontal lines and numbers above each condition represent the mean values. *P*-values were calculated using two-tailed Mann-Whitney tests.

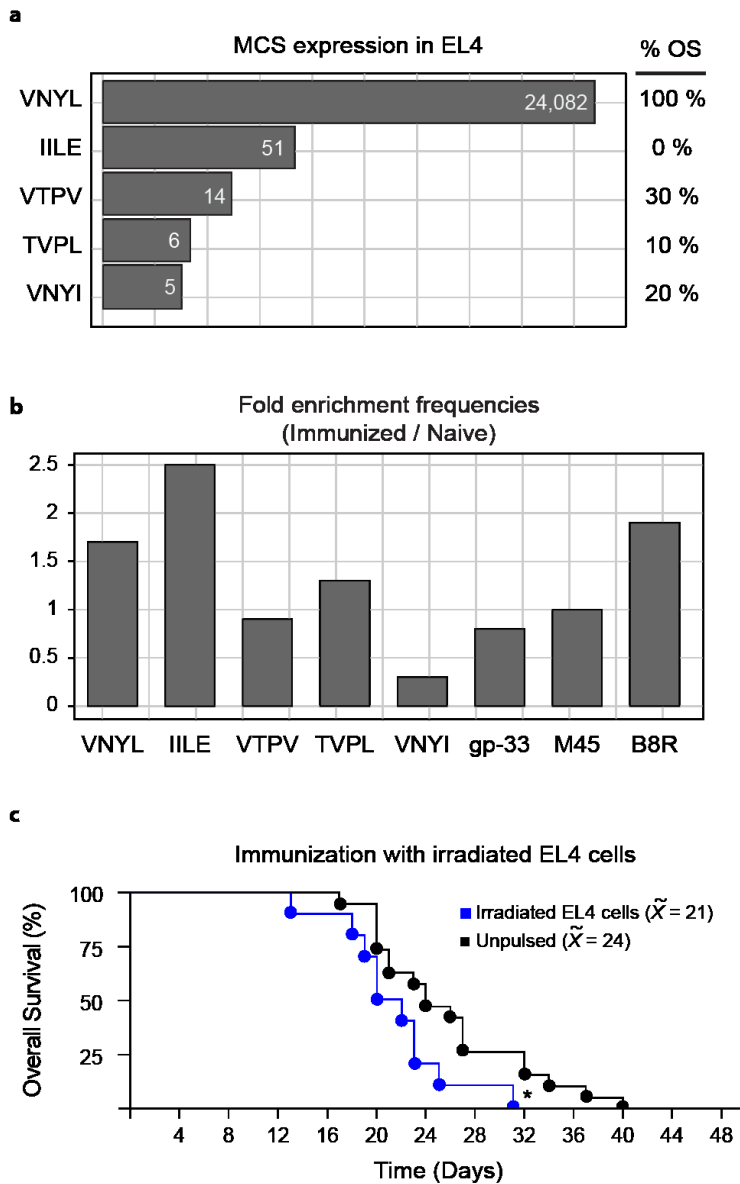
Interestingly, we found that the amplitude of T-cell expansion poorly correlated with the strength of antileukemic responses (**Supplementary Fig. 5.8**). Indeed, while mice immunized against VTPVYQHL were second to best responders *in vivo*, after immunization, antigen-specific T cells were barely detectable (**Fig. 5.3c, Fig. 5.4b, c** and **Supplementary Fig. 5.6a**). In contrast, VNYIHRNV had the highest and most reactive T-cell repertoire in all frequencies calculated, but it induced third to best antileukemic responses *in vivo* (**Fig. 5.3b, Fig. 5.4b, c** and **Supplementary Fig. 5.6a**). Therefore, in the case of TSAs, both the properties of antigen-specific T cells and of the antigens *per se* might be important to explain their respective immunodominance.

#### **5.6.4 High expression of antigens at the surface of leukemic cells is necessary but not sufficient to induce antileukemic responses.**

As a proxy for antigen clonality, we first evaluated the expression of each EL4-derived TSA's MCS in the EL4 transcriptome, reasoning that the observed MCS expression continuum would correspond to a clonality probability continuum, with the most expressed antigens having higher chances of being clonal than the least expressed ones. By doing so, we could rank the antigens as follows: VNYLHRNV >>> IILEFHSL > VTPVYQHL > TVPLNHNTL > VNYIHRNV, VNYLHRNV being from far the most highly expressed antigen (**Fig. 5.5a**). Interestingly, excluding ae-sTSAs, this MCS expression perfectly followed the gradation in overall survival derived from **Figure 5.3**. In line with a recent study positively linking antigen clonality with overall survival in humans<sup>61</sup>, our observation further reinforces the fact that a high antigen clonality is indeed required for the establishment of strong and durable antileukemic responses upon vaccination.

To investigate whether endogenous expression of our TSAs was sufficient to induce priming of CD8 T cells and promote antileukemic responses, we performed a tetramer-based enrichment of antigen-specific CD8 T cells in mice that were solely injected with EL4 cells, and compared the amplification of the T-cell repertoire to that of naive mice. We were unable to detect a significant enrichment in TSA-specific T cells compared to that of T cells specific for the viral peptides gp-33, M45 and B8R (**Fig. 5.5b** and **Supplementary Fig. 5.6b**). Of note, even though VNYLHRNV had a very high peptide copy number per cell, we did not observe a

significant amplification of this antigen-specific T-cell repertoire. Moreover, the survival curve of mice immunized with  $10^6$  irradiated EL4 cells was similar to that of controls immunized with unpulsed DCs (Fig. 5.5c). The main implication is that, at least in our experimental conditions, TSAs are immunogenic when presented by dendritic cells, but not when presented by EL4 cells.



**Figure 5.5. High expression of EL4-derived TSAs is necessary but not sufficient to induce antileukemic responses.** (a) MAP-coding sequences of EL4-derived TSAs span a wide range of expression, which can be used as a proxy for antigen clonality. Relevant MCS were split into 24 nucleotide-long k-mers and queried in the 24 nucleotide-long EL4 k-mer database. Obtained counts were averaged and normalized to the total number of EL4 k-mers. (b) Amplification of antigen-specific CD8 T cells after EL4 injection. Fold enrichment for pMHC I tetramers<sup>+</sup> CD8 T cells was calculated by dividing the mean frequency in EL4-injected mice by the mean frequency in naive mice. Fold enrichment for T cells recognizing viral peptides, which are not presented by EL4 cells, are shown as negative controls. (c) C57BL/6 female mice were immunized twice with EL4 cells irradiated at 10,000 cGy. Control groups were immunized with unpulsed DCs (depicted in black).  $\tilde{X}$  represents the median survival. 10 mice for irradiated EL4 cell immunization, 19 mice for control group.

## 5.7 Discussion

For now, the exploration of the TSA landscape has only been partial with the extensive characterization of exonic single-base-mutation and/or short InDel-derived TSAs by predictive studies, which are known to yield a high proportion of false prediction<sup>62,63</sup>. Therefore, to extend the landscape of truly presented TSAs, we present the community with a novel proteogenomic workflow able to identify non-tolerogenic TSAs, whether they derive from coding or non-coding regions, simple or complex rearrangements or simply cancer-restricted EREs. The core idea behind this workflow was simple: be targeted! So, to identify non-tolerogenic sequences, we did not try to map all RNA-sequencing reads and reconstruct potential mutations present in there. Rather, we just subtracted the right normal-matched signal, i.e. the one of mTEC<sup>hi</sup>, to the cancer signal and used the *in silico* translation of the resulting sequences as a database for MS. Compared to other techniques, our k-mer profiling workflow has several advantages: (i) It is fast. Generating the k-mer-derived portion of the augmented cancer database typically takes less than half a day. (ii) It is unbiased. It captures all cancer-specific sequences regardless of their nature as demonstrated by the identification of TSAs derived from non-coding regions as well as one TSA derived from a deletion of ~7,500 base pairs. (iii) It is modular. To enrich for non-tolerogenic sequences, we decided to filter our cancer data on mTEC<sup>hi</sup>. Although it appeared to be a good proxy for peripheral expression of antigens (**Fig. 5.2b, c**), you can filter your data as you like. If normal to you means removing all ENCODE data or adding dbSNP to the mix, you can! You just need to generate the associated k-mer database and add it to the collection of normal samples to be filtered against. Finally, although we never tested it, this workflow could theoretically be used to characterize the landscape of TSAs bound to MHC class II molecules, as it would just require to increase the k-mer length parameter from 33 to 54 nucleotides, MHC II-associated peptides generally ranging from 13 to 18 amino acid-long<sup>64,65</sup>.

As a proof-of-concept, we applied this workflow on EL4 cells, which lead us to identify a total of 5 TSAs, all derived from non-coding regions (**Table 5.1**). Moreover, we applied our approach on a murine colorectal cell line, CT26, and, as preliminary results, identified 3 TSAs, two of which derived from non-synonymous mutations and one that derived from an ERE (**data not shown**). This striking observation clearly demonstrates that exonic regions minimally contribute to the TSA landscape of tumors and further reinforces the idea that clinical TSA

discovery workflows would benefit from the inclusion of non-coding regions in their search space. Moreover, our estimation of the non-coding contribution to the TSA landscape is likely to be an underestimation: although our k-mer profiling generates smaller databases, they still contain some irrelevant sequences because of the 3-frame translation we perform. Finally, not only the nature (i.e coding vs. non-coding) of the TSAs we identified matters, their type matters too. In fact, our best candidates are MAPs derived from one large deletion and one normal ERE, whose expression was restricted to cancer cells. Such TSAs are very interesting targets for cancer immunotherapy as, on one hand, it is well known that chromosomal rearrangements, have been identified in several cancer types including lowly mutated ones such as leukemia<sup>14</sup> and could therefore expand significantly their respective TSA landscape. Besides, focusing on the 10,000 gene fusions identified up to now, we know that about 3% of them are recurrent, making them likely to be driver mutations and therefore very appealing targets for cancer immunotherapy. On the other hand, ERE-derived MAPs do not seem to require any mutations to be highly immunogenic. In fact, their expression being silent in normal cells but not in cancer cells makes them unlikely to induce tolerance in T cells<sup>21,22,66</sup>, while their viral origin guarantees them to be targeted by strong immune responses<sup>23,24 22,23,25-28</sup>. Moreover, while protein-coding genes represent only 2%, EREs represent about 43 and 37% of the human and mouse genome<sup>22</sup>, which make them very likely to generate MAPs in cancer. Altogether these data suggest that our proteogenomic approach is able to identify cryptic TSAs that could be shared between several patients and therefore facilitate the development of T-cell-based immunotherapies by limiting its personalized aspect, while increasing its efficacy.

From our *in vivo* experiments on EL4-bearing mice immunized with our 5 TSAs individually, we found that mutated and ERE-derived TSAs generated the strongest antileukemic responses (**Fig. 5.3**) and allowed us to hierarchize our TSAs as follows: ae-ereTSA > m-sTSA > m-ereTSA > ae-sTSAs. Interestingly, in our experimental setting, we saw no correlation between the overall survival and the frequency of antigen-specific T cells in the naive and primed repertoire (**Supplementary Fig. 5.8**). This is in contrast with our previously published observations demonstrating that the immunogenicity of antigens derived from non-synonymous germline polymorphisms is solely dependent on the frequency and functional avidity of antigen-specific CD8 T cells<sup>4</sup>. However, these antigens differ from TSAs by one key

feature: their clonality. In fact, because their supporting mutation is of germline origin, they can only be clonal antigens, while mTSAs, which are supported by somatic mutations, can be both clonal and subclonal. As a consequence, properties of the antigen *per se* become important in the selection of protective TSAs, which lead to the idea that clonal TSAs trigger better immune responses than subclonal ones<sup>61</sup>. Comparing the results obtained for our two ereTSAs, both derived from MMTV but differing by one single-base mutation (I/L), clearly demonstrate this. In fact, although T cells targeting these antigens had similar characteristics (frequency, reactivity and overall avidity, **Fig. 5.4**), a difference in their antigen clonality (**Fig. 5.5a, b**) was sufficient to explain an 80% increase in overall survival: vaccination against the clonal VNYLHRNV epitope conferring full protection against leukemia development, while vaccination against the subclonal VNYIHRNV epitope only induced a delay in leukemia onset and 20% overall survival (**Fig. 3b**). Altogether, those observations supports the idea that although T cells may be quite potent, antigen expression on EL4 cells is equally important for antileukemic responses induced by TSAs. Finally, one salient finding from our *in vivo* and *in vitro* assays was that, even for clonal antigens such as VNYLHRNV, endogenous expression of the antigens on EL4 cells was never sufficient to prime antigen-specific T cells and generate potent antileukemic responses (**Fig. 5.5c, d**). As such, our results further confirm that priming of antigen-specific CD8 T cells is a prerequisite for efficient antileukemic responses<sup>7</sup>.

A more puzzling observation is the response rate of EL4 challenge for VTPVYQHL immunized mice compared to that of TVPLNHNTL and IILEFHSL immunized mice. In contrast to VNYLHRNV and VNYIHRNV, CD8 T cells specific for our three other antigens were found in very low abundance and barely amplified upon immunization (**Fig. 5.4**). Moreover, these antigens appeared to be equally expressed in EL4 cells and were classified as subclonal (**Fig. 5.5a**). Nonetheless, we found that mice immunized against VTPVYQHL survived better than mice immunized against VNYIHRNV (30% and 20% overall survival respectively) and one mouse in each group of TVPLNHNTL and IILEFHSL immunized-mice displayed some degree of long-term disease control (**Fig. 5.3**). Several explanations can be envisioned to explain such paradoxical observations.

First, it is possible that, in the case of lowly expressed antigens with low antigen-specific T cell repertoire, the nature of the antigens *per se* plays an important role in overall

immunogenicity. While VTPVYQHL is derived from a large deletion, TVPLNHNTL and IILEFHSL are both derived from non-mutated, aberrantly expressed transcripts (**Table 5.1**). It has been proposed that the degree of difference between wild type and mutated sequences might influence peptide recognition by T cells; more differences in the sequences leading to the generation of more immunogenic antigens. Thus, large InDels, fusions and inversions should be more immunogenic than non-synonymous single nucleotide variants (**nsSNVs**) or aberrantly expressed self-antigens<sup>67</sup>. In line with this, *in silico* assays demonstrated that small frameshift causing InDels generated peptides that were predicted to bind more strongly the MHC molecules compared to nsSNVs. Moreover, these rearrangements could generate quantitatively and qualitatively more potent antigens and were better predictors of response to immune checkpoint inhibitor therapy, when compared to nsSNVs<sup>8</sup>. Based on these observations, it is reasonable to speculate that, because of its nature, VTPVYQHL could be more immunogenic than TVPLNHNTL or IILEFHSL.

Finally, the apparent stochastic survival of VTPVYQHL, TVPLNHNTL and IILEFHSL immunized mice might in part be attributable to inefficient priming of our low-frequency T-cell repertoires. Indeed, effective immunization requires for a sufficient number of antigen-specific T cells to encounter a significant number of antigen-presenting cells<sup>23</sup>. Our results suggest that, in the case of lowly abundant antigen-specific T cells, the use of bone marrow-derived dendritic cells matured with LPS might be suboptimal for effective T-cell priming. Indeed, it has been recently demonstrated that *ex vivo* generation of these dendritic cells generates a heterogeneous population originating from both common dendritic cell precursor (**CDP**) and common monocyte precursor (**cMoP**)<sup>68</sup>. Moreover, the authors demonstrated that immunization with purified peptide pulsed cMoP-derived dendritic cells required 10-times more cell numbers than CDP-derived dendritic cells to achieve the same level of antitumor activity. This may be due to the inability of cMoP-derived dendritic cells to migrate efficiently to secondary lymphoid organs and their retention at the injection site<sup>68-70</sup>. As the frequency of both types of dendritic cells in bone marrow-derived cell cultures may vary from one experiment to another, this method of immunization might not ensure a fully efficient delivery of antigens to the proper T-cell repertoire. Indeed, if the proportion of cMoP-derived dendritic cells is higher in a bone marrow-derived cell cultures, chances of encounter with the peptide-pulsed DCs would be

further limited for antigen-specific T cells that are rare in the naive repertoire (**Fig. 5.3a**). Nonetheless, we can argue that the antigens that were able to induce strong immune responses in our suboptimal priming conditions are most likely highly immunogenic.

Alternative routes of immunization that would induce a less stochastic priming of antigen-specific CD8 T cells could increase the phenotype observed for VTPVYQHL, TVPLNHNTL and IILEFHSL. However, efficient priming of antigen-specific CD8 T cells is not a trivial task, as demonstrated by the abundance of reports investigating the efficacy of different approaches, ranging from direct delivery of the antigen, to dendritic cell injection<sup>71-73</sup> and adoptive transfer of antigen experienced T-cells<sup>74,75</sup>. Moreover, because of their nature, mutated TSAs have been considered as being unique to each individual and large clinical deployment of TSA-based therapies is perceived as a massive undertaking. As such, the fact that two of the most potent antigens identified in our study are derived from cancer-specific events that could be shared by multiple patients (ERE-derived and large deletion) opens up the idea of creating TSA-based off-the-shelf therapies. Many questions remain to be addressed in terms of prioritization of targets for clinical translation. Our results suggest that both T-cell frequency and antigen clonality are important metrics to assess antigen potency, but will need further confirmations.



## **5.8 Acknowledgments and disclosure**

### **Acknowledgements**

We thank the following members of IRIC core facilities for their sound advices and technical assistance: Patrick Gendron from the bioinformatic platform; Simon Comtois-Marotte, Emilie Cossette, Mathieu Courcelles, Chantal Durette and Joël Lanoix from the proteomic platform; Gaël Dulude and Danièle Gagné from the flow cytometry platform as well as Isabelle Caron from the animal care facility. We also thank the NIH tetramer core facility for providing reagents. C.M.L. is supported by a Cole foundation fellowship. C.P. and P.T. hold Canada Research Chairs in Immunobiology and in Proteomics and Bioanalytical Spectrometry, respectively.

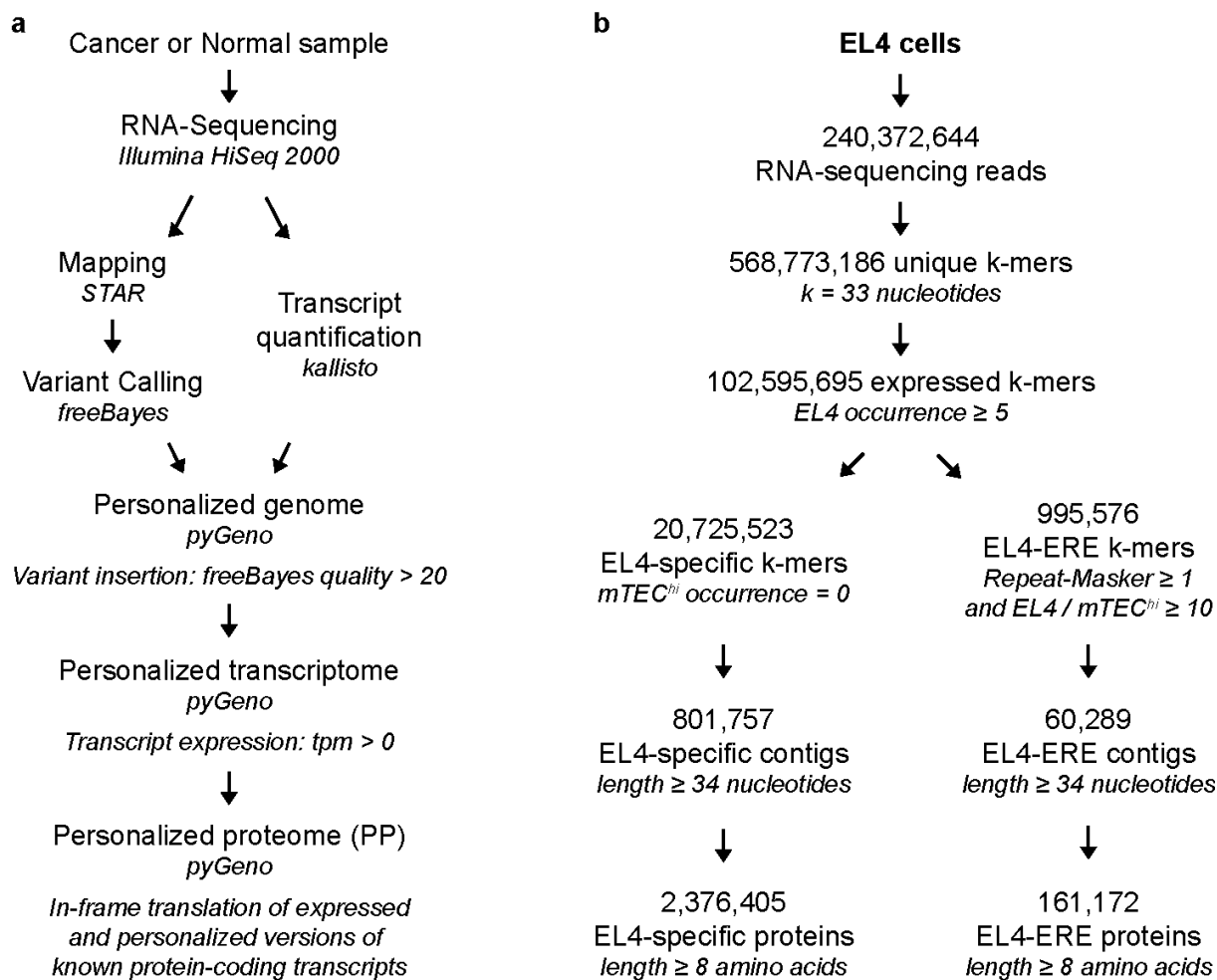
### **Competing financial interests**

The authors declare no competing financial interests.

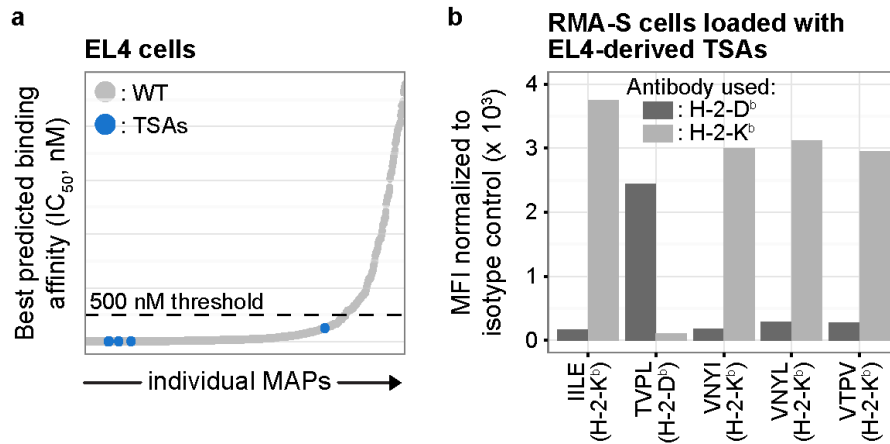
### **Materials & Correspondence**

Correspondence and requests for material should be addressed to C.P. (email: [claude.perreault@umontreal.ca](mailto:claude.perreault@umontreal.ca)).

## 5.9 Supplementary Figures



**Supplementary Figure 5.1. Analyses pertinent to the k-mer profiling strategy** (a) Workflow used to build personalized proteomes (PP). Considering a given normal or cancer sample, RNA-sequencing reads were first mapped on the reference genome (version GRCm38.87 and GRCh38.88 for murine and human samples, respectively) using STAR. freeBayes was used to identify and select high-quality single-base mutations that were further inserted in the reference genome with pyGeno to generate a personalized genome. From this, we exported personalized versions of expressed transcripts (personalized transcriptome) and those having a protein-coding biotype were further translated in their canonical reading frame to generate the associated personalized proteome. (b,c) Number of k-mers, contigs and proteins obtained following the application of the k-mer profiling strategy. Results for EL4 cells are presented in (b).

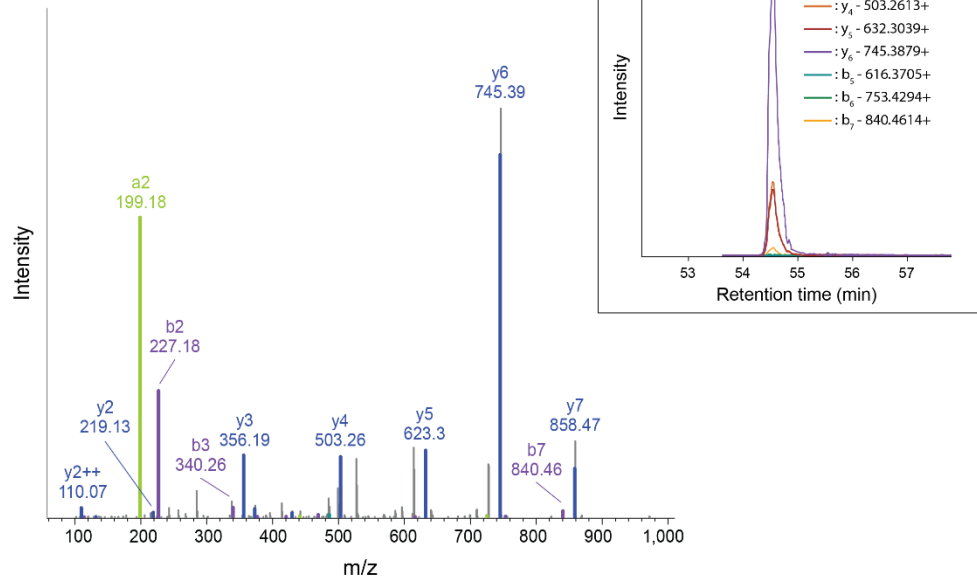


**Supplementary Figure 5.2. Identified TSAs are all expected to be good MHC I binders.** (a) Predicted binding affinities for MAPs eluted from EL4 and identified at a 5% FDR threshold. (b) For EL4-derived TSAs, binding to the relevant MHC I molecule was further validated by incubating  $10^{-4}$  M of each peptide with RMA-S cells followed by flow cytometry analysis (see Section MHC binding affinity). Bars represent the normalized MFI, i.e. the MFI of H-2K<sup>b</sup> or H-2D<sup>b</sup> antibodies minus the MFI of the relevant isotype control. For each peptide, the MHC I allele yielding the best predicted binding affinity, according to NetMHC 4.0, is indicated in brackets.

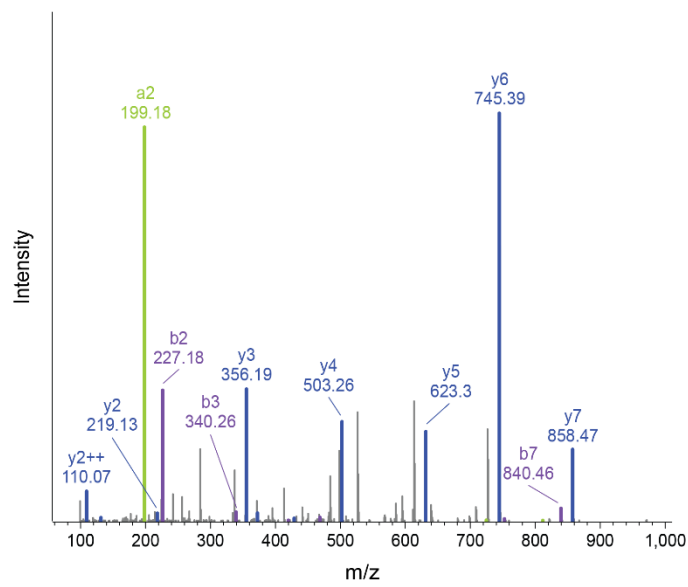
a

### IILEFHSL - ae-sTSA

Synthetic peptide



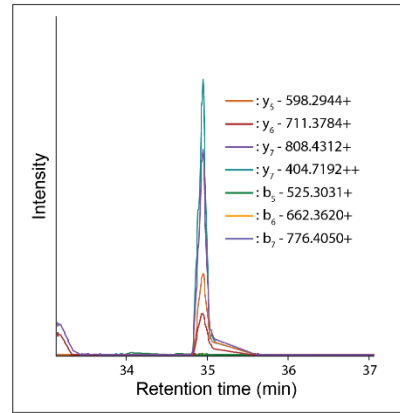
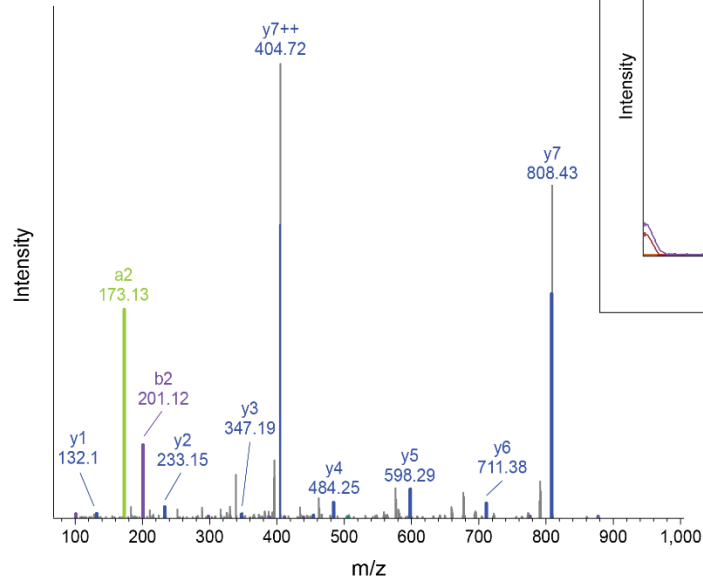
Endogenous peptide



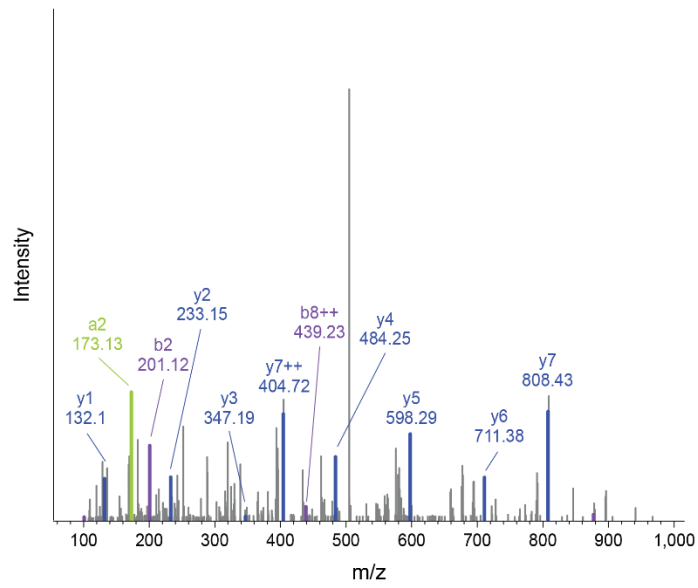
b

**TVPLNHNTL - ae-sTSA**

Synthetic peptide



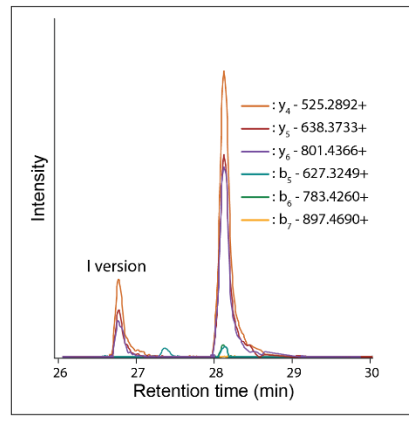
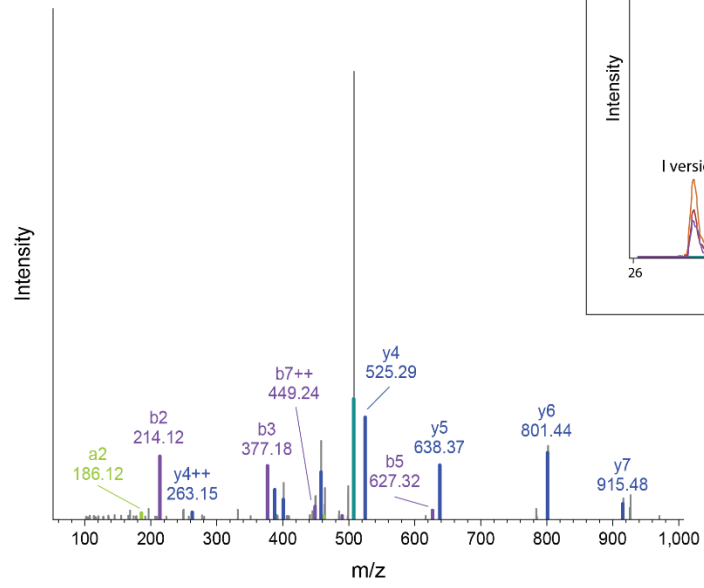
Endogenous peptide



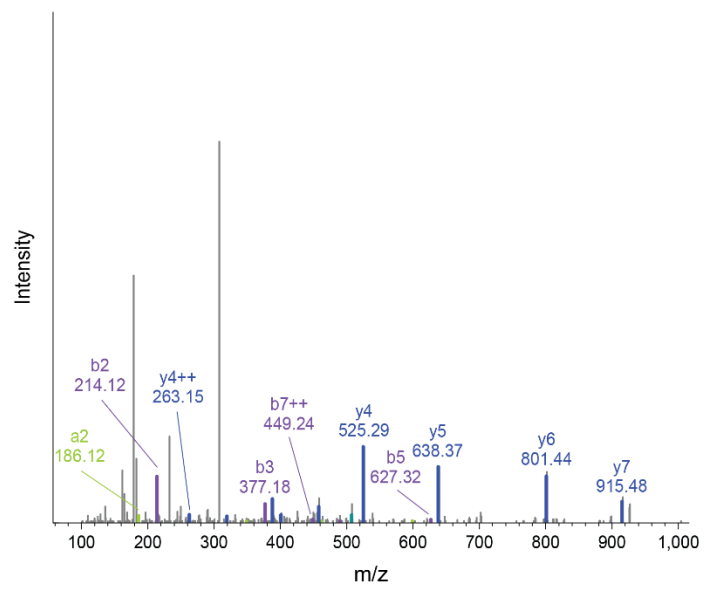
c

**VNYIHRNV - m-ereTSA**

Synthetic peptide



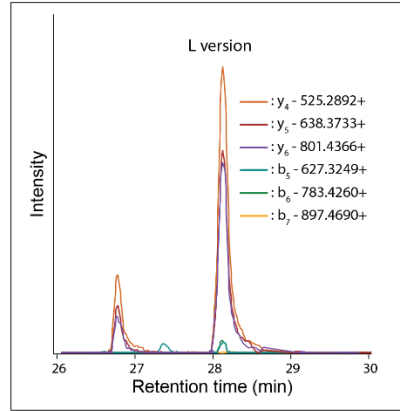
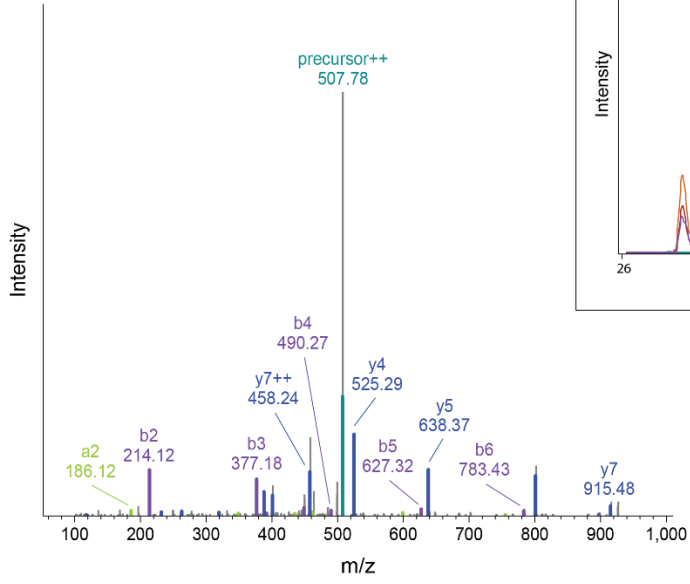
Endogenous peptide



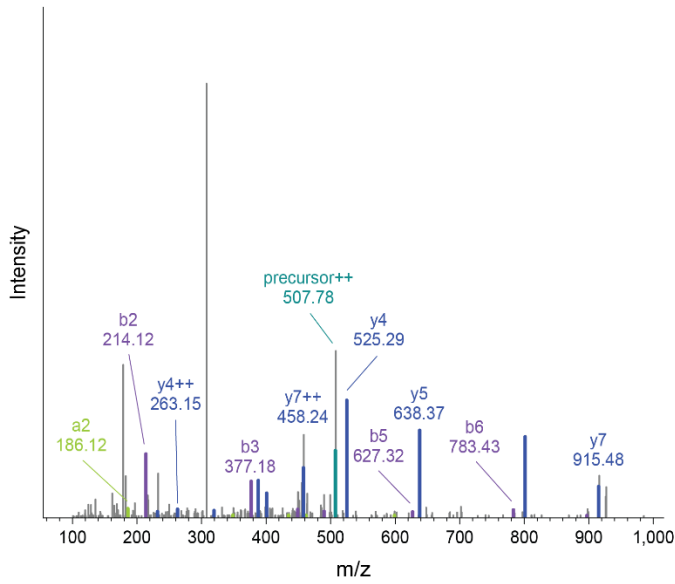
d

VNYLHRNV - ae-ereTSA

Synthetic peptide



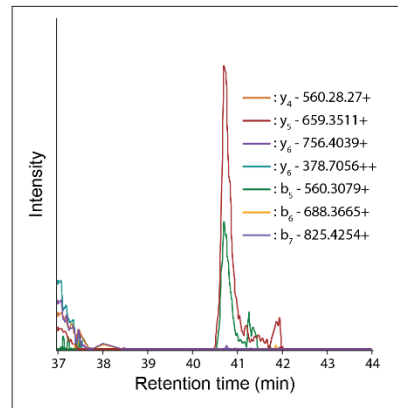
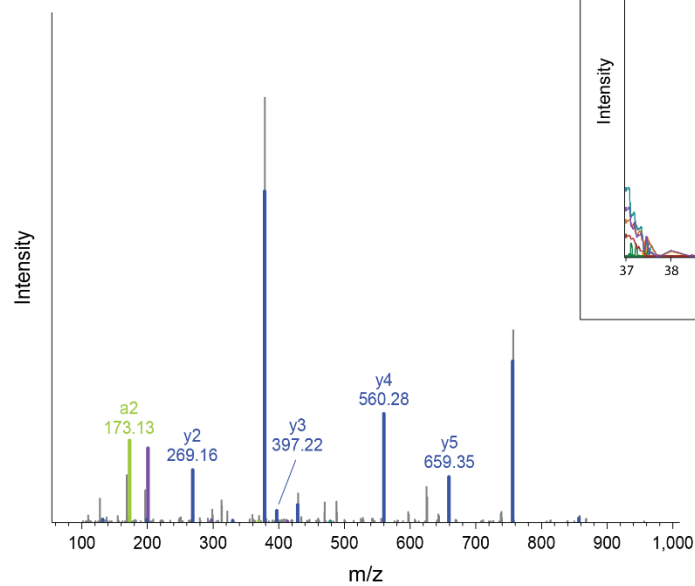
Endogenous peptide



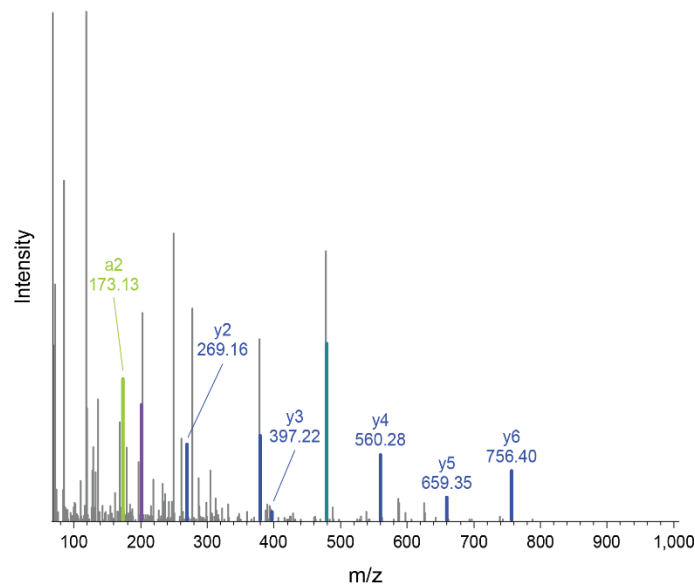
e

### VTPVYQHL - m-sTSA

Synthetic peptide

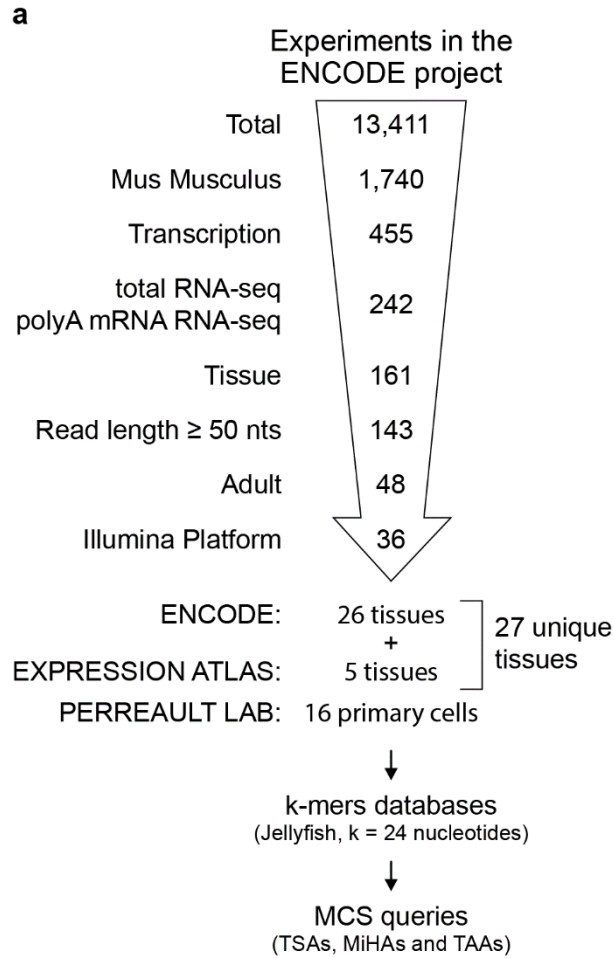


Endogenous peptide

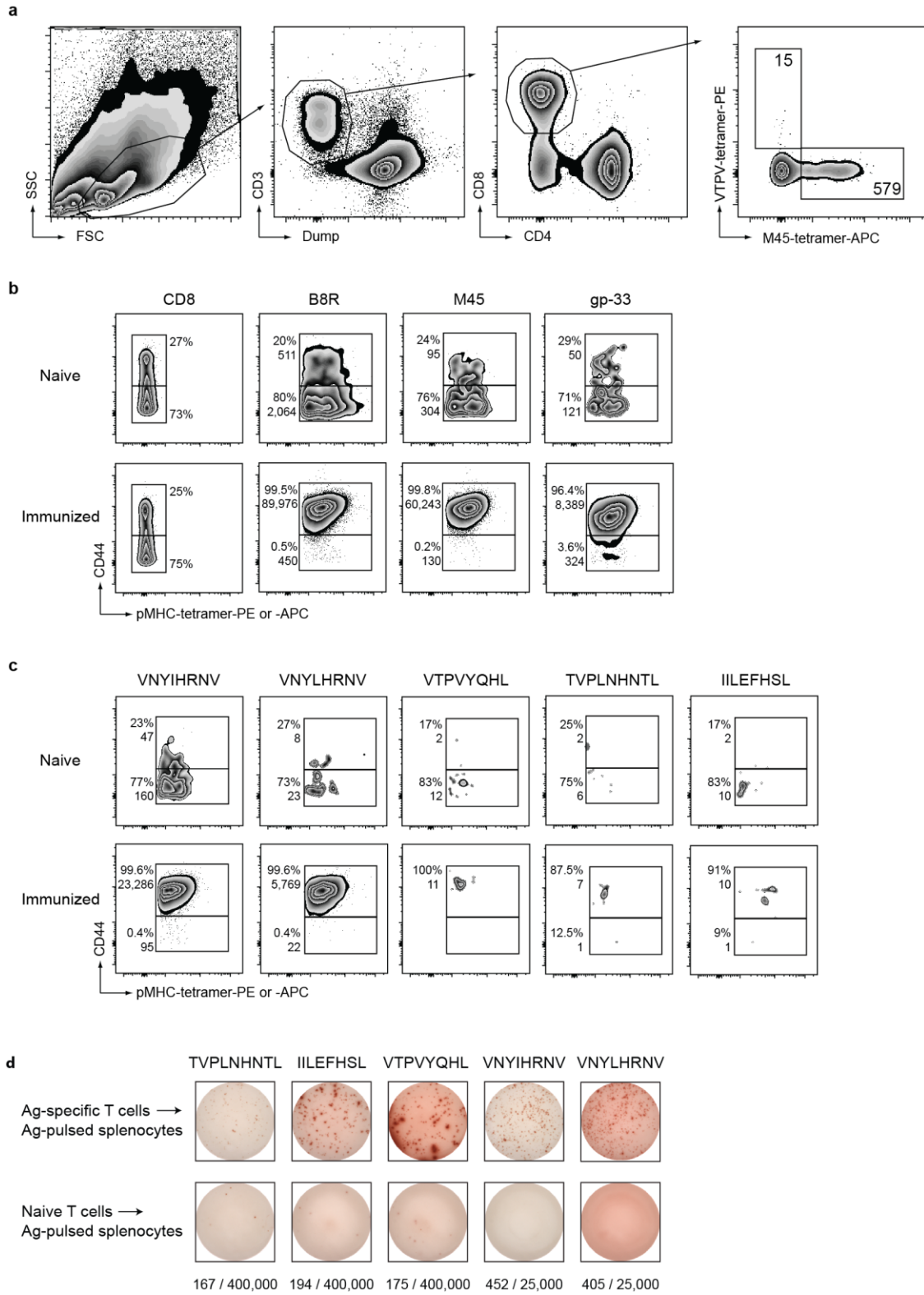


**Supplementary Figure 5.3. MS validation of identified TSAs using synthetic analogs. (a-e)** Endogenous and synthetic MS/MS spectra for EL4-derived TSAs. Three additional replicates of  $\sim 500 \times 10^6$  EL4 cells were analyzed by PRM MS to confirm the detection of the TSAs presented in Table 1a. For each TSA, one representative chromatogram (top right panel), synthetic spectrum (top left panel) and endogenous spectrum (lower panel) were extracted using Skyline. All EL4-derived TSAs were detected in three out of the three analyzed replicates.



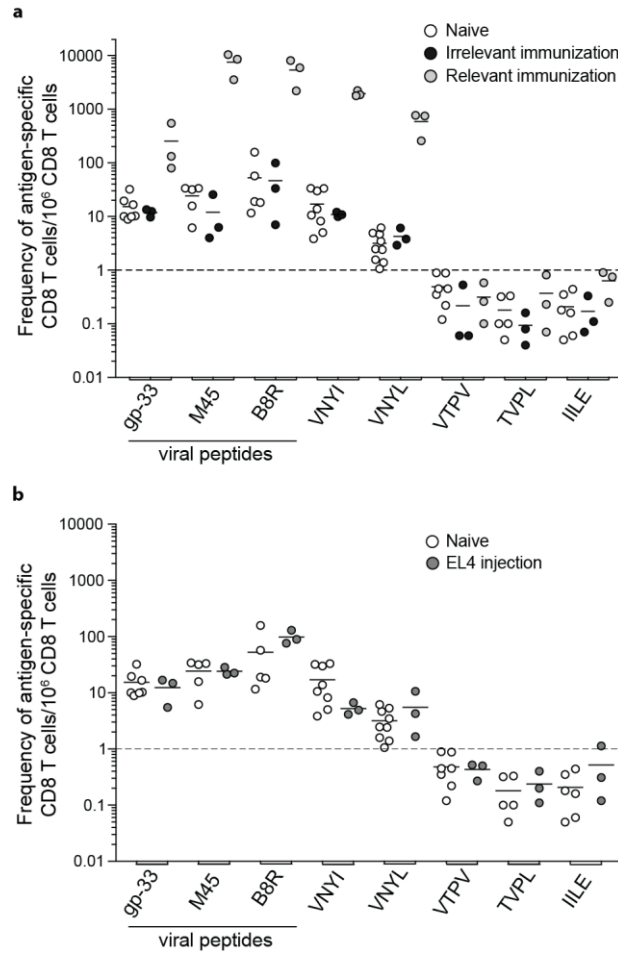


**Supplementary Figure 5.4. EL4-derived TSAs are unlikely to be centrally tolerized. (a)** Schematic detailing the selection process of C57BL/6 RNA-sequencing samples from peripheral tissues (ENCODE and EXPRESSION ATLAS) and primary cells (PERREAULT LAB). From fastq files, we generated 24 nucleotide-long k-mer databases for each of those samples and used them to estimate the expression of the MAP-coding sequences (**MCS**) encoding each of our EL4-derived TSAs (listed in **Table 1a**) along with those of four TAAs, previously detected on EL4 cells by MS and know to be tolerized<sup>53</sup>.

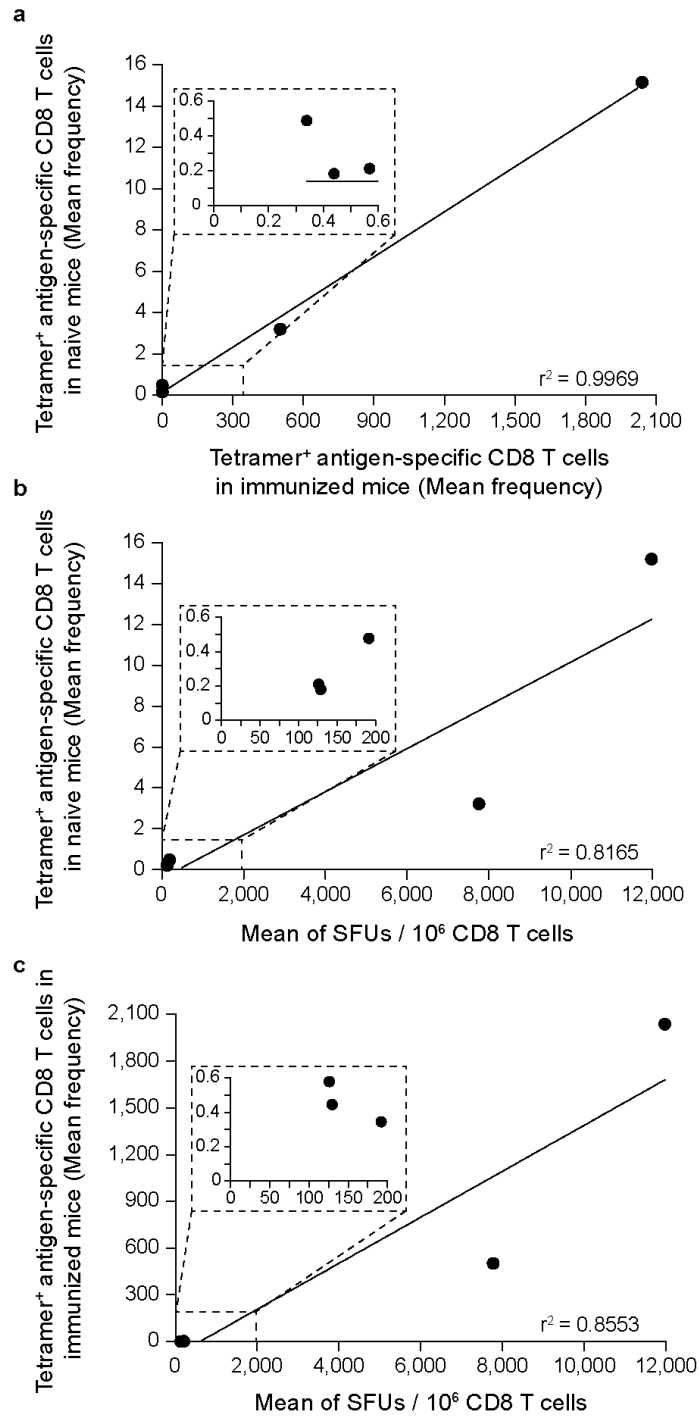


**Supplementary Figure 5.5. Detection of antigen-specific CD8 T cells in naive and pre-immunized mice.** (a) Gating strategy for the detection of pMHC tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells *ex vivo*.

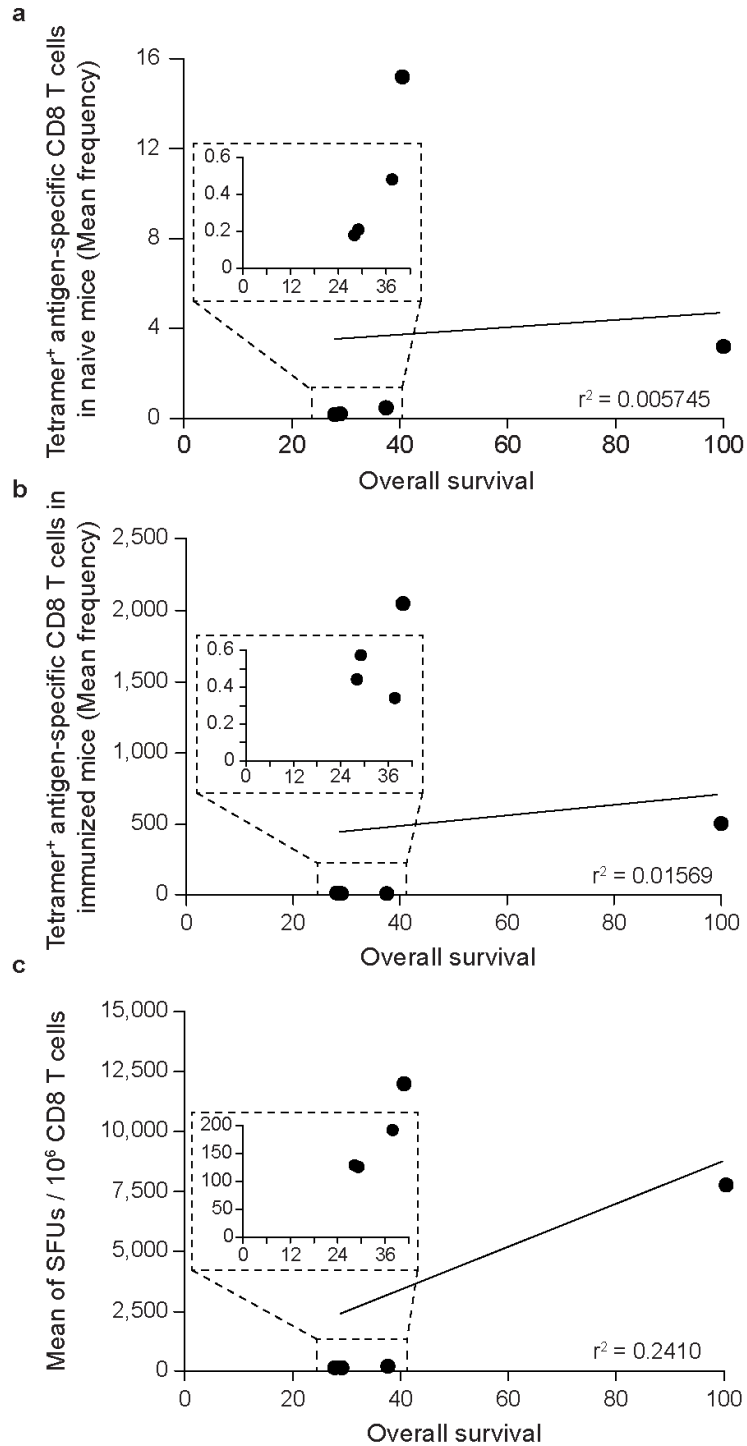
Tetramer enrichment were performed on single-cell suspensions isolated from the spleen and lymph nodes of each mice. After doublets exclusion, Dump<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> cells were analyzed for CD8 and CD4 expression and pMHC I tetramer<sup>+</sup> cells were analyzed in the CD8<sup>+</sup> compartment. A representative staining obtained following VTPV/H-2K<sup>b</sup>-PE and M45/H-2D<sup>b</sup>-APC tetramers enrichment in a naive mouse is shown. Absolute numbers of tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells detected for each specificities are indicated. The Dump channel corresponds to pooled events positive for dead cells, CD45R and CD19, F4/80, CD11b, CD11c. (b,c) Representative analysis of CD44 expression on antigen-specific CD8 T cells in naive (upper row) and pre-immunized (lower row) mice. The CD44 status of CD8<sup>+</sup> cells before magnetic enrichment (left panel b) and after *ex vivo* enrichment for tetramer<sup>+</sup> viral specificities (b) and TSA specificities (c) are represented. Percentages and number of CD44-positive or -negative cells are indicated. (d) One representative experiment of the frequency of IFN- $\gamma$  secreting CD8 T cells in immunized and naive mice. The number of spot forming units relative to the number of the number of plated CD8 T cells in each condition are indicated below each well.



**Supplementary Figure 5.6. Frequencies of antigen-specific T cells.** One representative experiment for (a) frequencies of antigen-specific T cells in mice immunized with relevant or irrelevant peptides and (b) frequencies of antigen-specific T cells in mice injected with EL4 cells. (a,b) *Ex vivo* frequencies of pMHC I tetramers<sup>+</sup> CD8 T cells are expressed as the number of antigen-specific CD8 T cells per  $10^6$  CD8 T cell. Each circle represents one mouse. Dotted lines represent the threshold of frequency already described with this technique.



**Supplementary Figure 5.7. Correlation between antigen-specific T cell frequencies in naive and pre-immunized mice.** (a,b) Correlation between the frequencies of antigen-specific CD8 T cells in the naive repertoire and in immunized mice as calculated by (a) tetramer staining and (b) IFN- $\gamma$  ELISpot assays. (c) Correlation between the frequencies of antigen-specific CD8 T cells in immunized mice as calculated by tetramer staining and IFN- $\gamma$  ELISpot assays. Average frequencies were used for plotting data. Fitness of curves was determined by the coefficient of determination ( $r^2$ ).



**Supplementary Figure 5.8. Correlation between antigen-specific T cell frequencies and survival of EL4-bearing mice.** Correlation between the median survival of EL4-bearing mice and the frequency of antigen-specific CD8 T cells in (a) naive mice and in (b,c) immunized mice as calculated by (b) tetramer staining and (c) IFN- $\gamma$  ELISpot assays. Average frequencies and median survival were used for plotting data. Fitness of curves was determined by the coefficient of determination ( $r^2$ ).

## 5.10 Supplementary Tables

Supplementary Table 5.1. RNA-Seq sample metrics

<b>Sample Name</b>	<b>Biosample Type</b>	<b>Replication Type</b>	<b>NbCells</b>	<b>BioAnalyser (RIN)</b>	<b>InputRNA (ng)</b>	<b>ReadType</b>	<b>TotalNbReads</b>
EL4	cell line	unreplicated	5 000 000	9,95	4000 ng	Paired-end	240 372 644
mTEChi_1	primary cells	biological	51 237	10	100 ng	Paired-end	159 208 840
mTEChi_2	primary cells	biological	31 686	9,2	100 ng	Paired-end	145 643 202
mTEChi_3	primary cells	biological	31 702	9,9	100 ng	Paired-end	152 139 924
thymocytes	primary cells	unreplicated	5 000 000	9,05	2000 ng	Paired-end	271 080 368

## 5.11 References

1. Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**, 298-306 (2012).
2. Johnson, L.A., *et al.* Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* **114**, 535-546 (2009).
3. Parkhurst, M.R., *et al.* T Cells Targeting Carcinoembryonic Antigen Can Mediate Regression of Metastatic Colorectal Cancer but Induce Severe Transient Colitis. *Mol Ther* **19**, 620-626 (2011).
4. Vincent, K., *et al.* Rejection of leukemic cells requires antigen-specific T cells with high functional avidity. *Biol Blood Marrow Transplant* **20**, 37-45 (2014).
5. Vigano, S., *et al.* Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? *Clin Dev Immunol* **2012**, 153863 (2012).
6. Zhong, S., *et al.* T-cell receptor affinity and avidity defines antitumor response and autoimmunity in T-cell immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6973-6978 (2013).
7. Sahin, U., *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **547**, 222-226 (2017).
8. Turajlic, S., *et al.* Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. *Lancet Oncol* **18**, 1009-1021 (2017).
9. Yadav, M., *et al.* Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* **515**, 572-576 (2014).
10. Pearson, H., *et al.* MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J Clin Invest* **126**, 4690-4701 (2016).
11. Tran, E., *et al.* Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science* **350**, 1387-1390 (2015).
12. Gros, A., *et al.* Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med* **22**, 433-438 (2016).
13. Bassani-Sternberg, M., *et al.* Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun* **7**, 13404 (2016).



14. Mertens, F., Johansson, B., Fioretos, T. & Mitelman, F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer* **15**, 371-381 (2015).
15. Baca, S.C., *et al.* Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* **153**, 666-677 (2013).
16. Hayward, N.K., *et al.* Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* **545**, 175-180 (2017).
17. Khurana, E., *et al.* Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nat Rev Genet* **17**, 93-108 (2016).
18. Laumont, C.M., *et al.* Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nat Commun* **7**, 10238 (2016).
19. Rooney, M.S., Shukla, S.A., Wu, C.J., Getz, G. & Hacohen, N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* **160**, 48-61 (2015).
20. Charoentong, P., *et al.* Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade. *Cell Rep* **18**, 248-262 (2017).
21. Anwar, S.L., Wulaningsih, W. & Lehmann, U. Transposable Elements in Human Cancer: Causes and Consequences of Deregulation. *Int J Mol Sci* **18**(2017).
22. Kassiotis, G. & Stoye, J.P. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat Rev Immunol* **16**, 207-219 (2016).
23. Kershaw, M.H., *et al.* Immunization against endogenous retroviral tumor-associated antigens. *Cancer Res* **61**, 7920-7924 (2001).
24. Sacha, J.B., *et al.* Vaccination with cancer- and HIV infection-associated endogenous retrotransposable elements is safe and immunogenic. *J Immunol* **189**, 1467-1479 (2012).
25. Malarkannan, S., Serwold, T., Nguyen, V., Sherman, L.A. & Shastri, N. The mouse mammary tumor virus env gene is the source of a CD8+ T-cell-stimulating peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule in a murine thymoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13991-13996 (1996).
26. Huang, A.Y., *et al.* The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9730-9735 (1996).

27. Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., Boon, T. & Coulie, P.G. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* **62**, 5510-5516 (2002).
28. Takahashi, Y., *et al.* Regression of human kidney cancer following allogeneic stem cell transplantation is associated with recognition of an HERV-E antigen by T cells. *J Clin Invest* **118**, 1099-1109 (2008).
29. Kim, M.J., Miller, C.M., Shadrach, J.L., Wagers, A.J. & Serwold, T. Young, proliferative thymic epithelial cells engraft and function in aging thymuses. *J Immunol* **194**, 4784-4795 (2015).
30. Dobin, A., *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21 (2013).
31. Quinlan, A.R. & Hall, I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841-842 (2010).
32. Caron, E., *et al.* The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol Syst Biol* **7**, 533 (2011).
33. Andreatta, M. & Nielsen, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics* **32**, 511-517 (2016).
34. Robinson, J.T., *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**, 24-26 (2011).
35. Bereman, M.S., *et al.* An Automated Pipeline to Monitor System Performance in Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Proteomic Experiments. *J Proteome Res* **15**, 4763-4769 (2016).
36. Yue, F., *et al.* A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**, 355-364 (2014).
37. Barbosa-Morais, N.L., *et al.* The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science* **338**, 1587-1593 (2012).
38. Patenaude, J. & Perreault, C. Thymic Mesenchymal Cells Have a Distinct Transcriptomic Profile. *J Immunol* **196**, 4760-4770 (2016).
39. St-Pierre, C., Trofimov, A., Brochu, S., Lemieux, S. & Perreault, C. Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. *J Immunol* **195**, 498-506 (2015).

40. Dumont-Lagace, M., St-Pierre, C. & Perreault, C. Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells. *Sci Rep* **5**, 12895 (2015).
41. Dumont-Lagace, M., Brochu, S., St-Pierre, C. & Perreault, C. Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *J Immunol* **192**, 2219-2226 (2014).
42. de Verteuil, D.A., *et al.* Immunoproteasomes shape the transcriptome and regulate the function of dendritic cells. *J Immunol* **193**, 1121-1132 (2014).
43. de Verteuil, D., *et al.* Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol Cell Proteomics* **9**, 2034-2047 (2010).
44. Moon, J.J., *et al.* Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* **27**, 203-213 (2007).
45. Legoux, F.P. & Moon, J.J. Peptide:MHC tetramer-based enrichment of epitope-specific T cells. *J Vis Exp* (2012).
46. McFarland, H.I., Nahill, S.R., Maciaszek, J.W. & Welsh, R.M. CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *J Immunol* **149**, 1326-1333 (1992).
47. Chadburn, A., Inghirami, G. & Knowles, D.M. Hairy cell leukemia-associated antigen LeuM5 (CD11c) is preferentially expressed by benign activated and neoplastic CD8 T cells. *Am J Pathol* **136**, 29-37 (1990).
48. Nesvizhskii, A.I. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. *Nat Methods* **11**, 1114-1125 (2014).
49. Noble, W.S. Mass spectrometrists should search only for peptides they care about. *Nat Methods* **12**, 605-608 (2015).
50. Murphy, J.P., *et al.* MHC-I Ligand Discovery Using Targeted Database Searches of Mass Spectrometry Data: Implications for T-Cell Immunotherapies. *J Proteome Res* **16**, 1806-1816 (2017).
51. Granados, D.P., *et al.* Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat Commun* **5**, 3600 (2014).

52. Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L.J. & Mann, M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics* **14**, 658-673 (2015).
53. Fortier, M.H., *et al.* The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J Exp Med* **205**, 595-610 (2008).
54. Jenkins, M.K. & Moon, J.J. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol* **188**, 4135-4140 (2012).
55. Obar, J.J., Khanna, K.M. & Lefrancois, L. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* **28**, 859-869 (2008).
56. La Gruta, N.L., *et al.* Primary CTL response magnitude in mice is determined by the extent of naive T cell recruitment and subsequent clonal expansion. *J Clin Invest* **120**, 1885-1894 (2010).
57. Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R. & Heath, W.R. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol* **31**, 137-161 (2013).
58. Baaten, B.J., Tinoco, R., Chen, A.T. & Bradley, L.M. Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44. *Front Immunol* **3**, 23 (2012).
59. Laugel, B., *et al.* Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties. *J Biol Chem* **282**, 23799-23810 (2007).
60. Richards, D.M., Kyewski, B. & Feuerer, M. Re-examining the Nature and Function of Self-Reactive T cells. *Trends Immunol* **37**, 114-125 (2016).
61. McGranahan, N., *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* **351**, 1463-1469 (2016).
62. Assarsson, E., *et al.* A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection. *J Immunol* **178**, 7890-7901 (2007).
63. Martin, S.D., *et al.* Low Mutation Burden in Ovarian Cancer May Limit the Utility of Neoantigen-Targeted Vaccines. *PLoS One* **11**, e0155189 (2016).
64. Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A. & Janeway, C.A., Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622-627 (1991).

65. Meydan, C., Otu, H.H. & Sezerman, O.U. Prediction of peptides binding to MHC class I and II alleles by temporal motif mining. *BMC Bioinformatics* **14 Suppl 2**, S13 (2013).
66. Szpakowski, S., *et al.* Loss of epigenetic silencing in tumors preferentially affects primate-specific retroelements. *Gene* **448**, 151-167 (2009).
67. Capietto, A.H., Jhunjhunwala, S. & Delamarre, L. Characterizing neoantigens for personalized cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **46**, 58-65 (2017).
68. Helft, J., *et al.* GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* **42**, 1197-1211 (2015).
69. Wimmers, F., Schreibelt, G., Skold, A.E., Figdor, C.G. & De Vries, I.J. Paradigm Shift in Dendritic Cell-Based Immunotherapy: From *in vitro* Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets. *Front Immunol* **5**, 165 (2014).
70. Williams, M. & Malissen, B. A Death Notice for In-Vitro-Generated GM-CSF Dendritic Cells? *Immunity* **42**, 988-990 (2015).
71. Melief, C.J., van Hall, T., Arens, R., Ossendorp, F. & van der Burg, S.H. Therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest* **125**, 3401-3412 (2015).
72. Guo, C., *et al.* Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res* **119**, 421-475 (2013).
73. Melero, I., *et al.* Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 509-524 (2014).
74. Baruch, E.N., Berg, A.L., Besser, M.J., Schachter, J. & Markel, G. Adoptive T cell therapy: An overview of obstacles and opportunities. *Cancer* **123**, 2154-2162 (2017).
75. Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* **348**, 62-68 (2015).

# **Chapitre 6**

DISCUSSION

## **6. Discussion**

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse avaient pour but de répondre à une question fondamentale pour l'avenir de l'immunothérapie du cancer : Quels sont les meilleurs antigènes à cibler sur les cellules cancéreuses pour les ATC antigènes-spécifiques. Afin d'effectuer une comparaison exhaustive des différents types d'antigènes pouvant induire des réponses anti-leucémiques, nous avons développé une approche d'identification de TSA à grande échelle combinant la spectrométrie de masse et des données de séquençage puis, avons déterminé quels sont les critères dictant l'immunogénicité des antigènes permettant l'élimination des cellules tumorales. Dans cette discussion, les résultats obtenus dans les chapitres 3 et 5 seront intégrés afin de dépeindre l'image globale de l'immunogénicité et du potentiel anti-leucémique des TAA, MiHA et TSA. Nous discuterons ensuite de la priorisation de ces différents types d'antigènes dans un contexte thérapeutique. Finalement, nous verrons comment les approches de thérapies personnalisées peuvent être améliorées dans le but d'en augmenter l'accessibilité.

## 6.1 Le potentiel thérapeutique des MiHA, TAA et TSA et les paramètres dictant leur immunogénicité

Afin de comparer le potentiel thérapeutique des MiHA, des TAA et des TSA, nous avons utilisé la lignée cellulaire EL4, un lymphoblastome murin dérivant de souris C57BL/6, puisque ce modèle comporte plusieurs avantages. D'abord, ce modèle cellulaire est bien caractérisé dans la littérature, facilitant son utilisation dans les expériences *in vivo* et *ex vivo*. Ensuite, la séquence de plusieurs MiHA fortement immunogènes a été élucidée dans les souris C57BL/6, incluant H3<sup>a</sup>, H7<sup>a</sup> et H13<sup>a</sup> <sup>1-5</sup>. En plus de ces trois antigènes, nous avons ajouté à notre sélection le MiHA H4<sup>a</sup>, un antigène peu immunogène, à titre de contrôle interne de faible réactivité<sup>6</sup>. Finalement, l'analyse du répertoire de peptides présentés par les molécules du CMH I des cellules EL4 a précédemment permis l'identification de TAA surexprimés dans ces cellules par rapport à leur contrepartie normale, les thymocytes<sup>7</sup>. Pour pouvoir effectuer une comparaison exhaustive des MiHA, des TAA et des TSA, nous avons également développé une approche protéogénomique nous permettant d'identifier tous les types de TSA présentés par les cellules EL4. Ces derniers ont été classifiés selon leur nature cancer-spécifique et leur origine génomique. Ainsi, nous avons identifié 2 TSA dérivant de transcrits exprimés de façon aberrante dans les cellules EL4, mais dont la séquence provient du « soi » (**ae-sTSA**), c'est-à-dire qu'elle ne comporte aucune mutation. Deux autres TSA identifiés ont été associés à un même épitope d'un rétroélément endogène (**ERE**) murin, le MMTV (virus murin de la tumeur mammaire), l'un représentant la séquence normale et l'autre représentant une séquence mutée (**ae-ereTSA** et **m-ereTSA**). Finalement, un antigène dérivant d'une large délétion a été identifié (**m-sTSA**). Le tableau 6.1 résume les différentes catégories d'antigènes ainsi que les séquences peptidiques associées. De plus, les résultats des principales propriétés évaluées ainsi que les figures associées à ces résultats sont résumés dans le tableau 6.2 et y seront référés comme tel.



**Tableau 6.1. Propriétés des MiHA, TSA et TAA utilisés dans cette thèse**

Classe	Séquence sur les cellules EL4	Abréviation	Tableau et page associée	Souris source de DC et immunisées	Séquence pouvant être présentée dans les souris	Séquence ciblée par les immunisations
MiHA	<u>A</u> SPC <u>N</u> STVL	H3 <sup>a</sup>	3.1, p.119	B10.H3b/H13b	<u>T</u> SP <u>R</u> NSTVL (H3 <sup>b</sup> )	<u>A</u> SPC <u>N</u> STVL (H3 <sup>a</sup> )
	SGT <u>V</u> YIHL	H4 <sup>a</sup>	3.1, p.119	B10.H4b	SG <u>I</u> VYIHL (H4 <sup>b</sup> )	SGT <u>V</u> YIHL (H4 <sup>a</sup> )
	KAPDNRETL	H7 <sup>a</sup>	3.1, p.119	B10.H7b	KAPDNR <u>D</u> TL (H7 <sup>b</sup> )	KAPDNRETL (H7 <sup>a</sup> )
	SSV <u>V</u> GVWYL	H13 <sup>a</sup>	3.1, p.119	B10.H3b/H13b	SSV <u>I</u> GVWYL (H13 <sup>b</sup> )	SSV <u>V</u> GVWYL (H13 <sup>a</sup> )
TSA	VNYLHRNV	ae-ere	5.1, p.181	C57BL/6	VNYLHRNV	VNYLHRNV
	VNY <u>I</u> HRNV	m-ere	5.1, p.181	C57BL/6	N.A.	VNY <u>I</u> HRNV
	VTPVYQ    HL	m-s	5.1, p.181	C57BL/6	N.A.	VTPVYQ    HL
	TVPLNHNTL	ae-s	5.1, p.181	C57BL/6	TVPLNHNTL	TVPLNHNTL
	IILEFHSL	ae-s	5.1, p.18	C57BL/6	IILEFHSL	IILEFHSL
TAA	NSMVLFDHV	N.A.	3.1, p.119	C57BL/6	NSMVLFDHV	NSMVLFDHV
	VAAANREVL	N.A.	3.1, p.119	C57BL/6	VAAANREVL	VAAANREVL
	SMYVPGKL	N.A.	3.1, p.119	C57BL/6	SMYVPGKL	SMYVPGKL
	STLTYSRM	N.A.	3.1, p.119	C57BL/6	STLTYSRM	STLTYSRM

N.A.; Non-applicable

ae-ere; antigène dérivant d'un rétroélément endogène et exprimé de façon aberrante

m-ere; antigène dérivant d'un rétroélément endogène et portant une mutation

m-s; antigène dérivant du « soi » et portant une mutation

ae-s; antigène dérivant du « soi » et exprimé de façon aberrante

**Tableau 6.2. Résumé des résultats des principales propriétés immunogènes évaluées**

Classe	Nom de l'antigène	Affinité (nM)	Tableau et page associée	% de survie après immunisation	Augmentation de la médiane de survie (Jours)	Figure et page associée
MiHA	H3 <sup>a</sup>	5,53	3.1, p.119	100	N.A.	3.2, p.122
	H4 <sup>a</sup>	60,06	3.1, p.119	0	0	3.2, p.122
	H7 <sup>a</sup>	37,51	3.1, p.119	100	N.A.	3.2, p.122
	H13 <sup>a</sup>	73,76	3.1, p.119	0	12 **	3.2, p.122
TSA	VNYLHRNV	5,12	5.1, p.181	100	N.A.	5.3b, p.184
	VNYIHRNV	6,25	5.1, p.181	20	16,5 **	5.3b, p.184
	VTPVYQHL	5,19	5.1, p.181	30	13,5 **	5.3c, p.184
	TVPLNHNTL	252,1	5.1, p.181	10	4	5.3a, p.184
	IILEFHSL	7,18	5.1, p.18	0	5	5.3a, p.184
TAA	NSMVLFDHV	466,68	3.1, p.119	0	0	3.2, p.122
	VAAANREVL	16,48	3.1, p.119	0	0,5	3.2, p.122
	SMYVPGKL	146,63	3.1, p.119	0	1,5 *	3.2, p.122
	STLTYSRM	12,44	3.1, p.119	0	0	3.2, p.125

\* $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.005$

N.A.; Non-applicable

**Tableau 6.2. Suite**

<b>Classe</b>	<b>Nom de l'antigène</b>	<b>Fréquence de lymphocytes T calculé par ÉLISpot (SFU)</b>	<b>Figure et page associée</b>	<b>Avidité fonctionnelle</b>	<b>Figure et page associée</b>
MiHA	H3 <sup>a</sup>	12 440	3.3d, p.123	11,35	3.6a, p.129
	H4 <sup>a</sup>	767	3.3d, p.123	N.A.	N.A.
	H7 <sup>a</sup>	16 380	3.3d, p.123	0,29	3.6a, p.129
	H13 <sup>a</sup>	4 827	3.3d, p.123	32,02	3.6a, p.129
TSA	VNYLHRNV	7 780	5.4c, p.187	0,11	5.4d, p.187
	VNYIHRNV	11 977	5.4c, p.187	0,30	5.4d, p.187
	VTPVYQHL	192	5.4c, p.187	N.A.	N.A.
	TVPLNHNTL	129	5.4c, p.187	N.A.	N.A.
	IILEFHSL	128	5.4c, p.187	N.A.	N.A.
TAA	NSMVLFDHV	262	3.3d, p.123	N.A.	N.A.
	VAAANREVL	366	3.3d, p.123	N.A.	N.A.
	SMYVPGKL	282	3.3d, p.123	N.A.	N.A.
	STLTYSRM	330	3.3d, p.123	N.A.	N.A.

N.A.; Non-applicable

### 6.1.1 Seules les souris immunisées avec des antigènes perçus comme du « non-soi » sont capables d'induire des réponses immunitaires contre les cellules EL4

Pour évaluer le potentiel thérapeutique de nos différents antigènes, nous avons d'abord généré des DC dérivant de la moelle osseuse de souris syngéniques C57BL/6 (génétiquement identiques) pour les TSA et les TAA, ou de souris congéniques aux C57BL/6 (génétiquement identiques à l'exception d'un locus) pour les MiHA. Après leur expansion et leur maturation *in vitro*, les DC ont été chargées avec les différents peptides et utilisées pour immuniser des souris par voie intraveineuse (**Tableau 6.1**). Celles-ci ont finalement été injectées avec des cellules EL4, puis évaluées pour leur capacité à les rejeter. Le but principal de nos travaux étant de comprendre comment la nature de l'antigène (MiHA, TAA et TSA) influence les réponses immunitaires et anti-tumorales, plutôt que d'identifier des candidats peptidiques spécifiques ayant un potentiel thérapeutique chez l'humain et pouvant être employés dans un contexte clinique, nous avons choisi une approche de vaccination prophylactique plutôt que thérapeutique. De plus, la progression rapide de la maladie dans les souris injectées avec des cellules EL4 et l'incapacité à déterminer la charge tumorale des animaux suite à l'inoculation nous ont permis de conclure que la vaccination thérapeutique n'était pas la technique la plus adaptée pour évaluer le potentiel anti-tumoral des antigènes étudiés dans notre modèle expérimental. Nous avons ainsi déterminé que les souris immunisées contre les 3 MiHA immunogènes (H3<sup>a</sup>, H7<sup>a</sup> et H13<sup>a</sup>) et les 5 TSA étaient capables, en différents degrés, de rejeter les cellules EL4. De plus, aucun effet bénéfique n'a été observé pour les souris immunisées contre les 4 TAA ou contre H4<sup>a</sup> (**Tableau 6.2**). Ainsi, ces résultats nous permettent de hiérarchiser les MiHA, les TSA et les TAA selon leur potentiel anti-leucémique:

$$H7^a > H3^a = \text{VNYLHRNV} > \text{VTPVYQHL} > \text{VNYIHRNV} > H13^a > \text{TVPLNHNTL} > \\ \text{IILEFHSL} > H4^a = \text{TAA} = \text{immunisation avec des DC non-pulsées}$$

D'abord, le potentiel anti-leucémique observé pour les MiHA récapitule les données d'immunodominance rapportées dans la littérature (H7<sup>a</sup> > H3<sup>a</sup> > H13<sup>a</sup> > H4<sup>a</sup>)<sup>8</sup>. Le MiHA H7<sup>a</sup> représente, dans notre modèle expérimental, l'antigène le plus immunogène, puisque des souris congéniques (B10.H7<sup>b</sup>) non-immunisées contre cet antigène sont capables de rejeter les cellules

EL4 dans 60% des cas (**Figure 3.2, page 122**). De plus, les souris immunisées contre H13<sup>a</sup> et VNYLHRNV ont chacune bénéficié d'un rejet complet des cellules EL4. Nous avons également observé un délai dans l'initiation des symptômes pour les souris immunisées contre VNYIHRNV et VTPVYQHL, en plus d'avoir noté un rejet complet des cellules EL4 dans 20% et 30% des cas, respectivement. Finalement, la hiérarchisation de H13<sup>a</sup>, et des deux ae-sTSA, TVPLNHNTL et IILEFHSL, est plus complexe. En effet, tandis que les souris immunisées contre H13<sup>a</sup> ont bénéficiés d'un délai dans l'induction des symptômes, aucune souris n'a survécu au-delà de 36 jours (**Figure 3.2, page 122**). En contrepartie, aucun délai dans l'induction des symptômes n'a été observé pour les souris immunisées indépendamment contre les deux ae-sTSA, mais un rejet à long terme des cellules EL4 a été observé pour 1 souris dans chaque groupe (**Figure 5.3, page 184**). Ainsi, puisque l'observation d'un délai dans l'initiation des symptômes dans les souris H13<sup>a</sup> signifie que globalement, toutes les souris immunisées sont en mesure de générer des réponses anti-tumorales, cet antigène a été classifié comme étant plus immunogène que les deux ae-sTSA. De façon importante, nos travaux démontrent que les souris immunisées contre les TAA sélectionnés sont incapables de rejeter les cellules leucémiques, même lorsqu'utilisés en combinaison (**Tableau 6.2 et Résultat non publié**). Ainsi, dans notre modèle, les TSA et les MiHA représentent les antigènes permettant l'induction des réponses anti-tumorales les plus fortes.

Puisque nos conditions de vaccination permettent l'amplification adéquate du répertoire de lymphocytes T avant l'inoculation des cellules EL4, l'approche prophylactique représente les conditions « optimales » de vaccination et nous permet de rapidement cibler les candidats intéressants de ceux qui ne le sont pas du tout. Ainsi, les antigènes classifiés comme ayant un faible potentiel anti-tumoral dans cette approche serait certainement classifiés comme tels dans un contexte de vaccination thérapeutique. En contrepartie, les conclusions concernant le potentiel anti-tumoral des antigènes démontrant un fort potentiel anti-tumoral en contexte de vaccination prophylactique pourraient être différentes en contexte de vaccination thérapeutique. Cependant, un antigène ne démontrant pas d'activité anti-tumorale dans une approche de vaccination thérapeutique ne devrait pas nécessairement être classifié comme un mauvais candidat. En effet, il est bien connu que le succès thérapeutique est positivement corrélé avec la

charge tumorale du patient<sup>9,10</sup>. De plus, le potentiel anti-tumoral d'un antigène dépend grandement de la méthode d'immunisation employée et sera discuté davantage à la section 6.1.5.

Ayant évalué le potentiel thérapeutique des différents types d'antigènes, nous avons ensuite tenté de comprendre quels sont les mécanismes dictant leur immunogénicité. Plusieurs facteurs peuvent influencer le niveau de réponse d'un lymphocyte T suite à sa rencontre avec un antigène. Certaines propriétés sont intrinsèques aux lymphocytes T, tel que leur fréquence dans le répertoire naïf, l'affinité du TCR pour le pCMH, l'abondance des TCR et l'abondance des molécules co-réceptrices et des molécules co-stimulatrices à la surface cellulaire. D'autres concernent directement l'antigène, tel que l'affinité du peptide pour les molécules du CMH I, la stabilité du complexe pCMH et l'abondance de l'antigène sur l'APC<sup>11-14</sup>.

### 6.1.2 Affinité du peptide pour les molécules du CMH

Des analyses de prédiction *in silico* de l'affinité de liaison des peptides pour les molécules du CMH I<sup>15,16</sup>, nous ont permis de déterminer que tous les antigènes utilisés dans nos travaux ont une affinité de liaison considérée comme étant forte, c'est-à-dire de moins de 500 nM<sup>17</sup>. De plus, des essais *in vitro* permettant d'évaluer l'affinité du peptide pour les molécules du CMH effectué pour les TAA et les MiHA n'a permis d'établir aucune corrélation entre l'affinité de liaison des peptides et leur potentiel anti-tumoral (**Figure 3.5c et e, page 127**). Ainsi, nos résultats supportent les études démontrant que les antigènes capables d'induire des réponses immunitaires sont ceux ayant de fortes affinités pour les molécules du CMH<sup>18-20</sup>. Cependant, nos résultats démontrent également que l'affinité des antigènes pour les molécules du CMH ne peut, à elle seule, permettre de prédire quels antigènes vont induire des réponses anti-leucémiques. Du fait que 40% des antigènes étudiés dans le cadre de nos travaux n'ont pas démontré d'effet anti-tumoral mais qu'ils auraient été priorisés pour tester leur potentiel thérapeutique, démontre que davantage de paramètres doivent être pris en considération lors de la sélection d'antigènes pour l'immunothérapie du cancer.

### 6.1.3 La fréquence des lymphocytes T antigène-spécifique

L'abondance des lymphocytes T antigène-spécifiques est l'un des paramètres dictant le potentiel immunogène d'un antigène. Nous avons donc mesuré la fréquence des lymphocytes T

dans des souris immunisées individuellement contre tous les antigènes grâce à deux techniques complémentaires. La fréquence des lymphocytes T a d'abord été calculée grâce à des marquages par tétramères. Cependant, deux techniques d'isolation de lymphocytes T largement différentes ont été utilisées pour calculer les fréquences des répertoires antigènes-spécifiques pour les MiHA et les TAA (**Figure 3.3, page 123**) et pour les TSA (**Figure 5.4, page 187**). En contrepartie, bien qu'elles aient été menées en temps différents, les expériences utilisant les essais d'ÉLISpot IFN- $\gamma$  pour calculer les fréquences de lymphocytes T antigène-spécifiques ont été menées exactement de la même manière. Tant dans le cas des MiHA et des TAA que dans le cas des TSA, nous avons démontré une excellente corrélation entre la quantification par marquage tetramères et par ÉLISpot IFN- $\gamma$  (**Figure 3.4a et Figure supplémentaire 5.7c, pages 124 et 207**). Néanmoins, pour des fins comparatives, seuls les résultats de quantification du répertoire de lymphocytes T antigène-spécifiques par ÉLISpot IFN- $\gamma$  ont été utilisés. Représentées en terme d'unité formant des points (SFU; Spot Forming Unit), les fréquences calculées pour les différents répertoires de lymphocytes T après immunisation peuvent être hiérarchisées comme suit :

H7<sup>a</sup> > H3<sup>a</sup> > VNYIHRNV > VNYLHRNV > H13<sup>a</sup> >>> Tous les autres antigènes (> 1000)

La corrélation entre les fréquences de lymphocytes T antigène-spécifiques et la survie globale des souris immunisées contre chaque antigène puis injectées avec des cellules EL4 est très instructive (**Figure 3.4b et Figure supplémentaire 5.8c, pages 124 et 208**). De façon générale, les antigènes pour lesquels les répertoires de lymphocytes T sont les plus abondants suite à une immunisation sont ceux contre lesquels les réponses anti-tumorales sont les plus fortes. De fait, les antigènes n'ayant pas, ou très peu induit de réponses anti-tumorales ont des fréquences inférieures à 1000 SFU. Néanmoins, cette corrélation est imparfaite.

D'abord, la fréquence des lymphocytes T spécifique à VTPVYQHL (192 SFU) est très faible et similaire à celle des antigènes les moins immunogènes (moyenne de 307 SFU). Néanmoins, les réponses anti-tumorales observées pour les souris immunisées contre cet antigène sont supérieures à celles observées pour des souris immunisées contre VNYIHRNV et H13<sup>a</sup>. De plus, malgré une très faible fréquence des lymphocytes T spécifiques à TVPLNHNTL et IILEFHSL, le rejet à long terme des cellules EL4 dans une souris de chaque groupe a été observé (**Tableau 6.2**). Il est important de noter que les études de quantification de la fréquence

du répertoire de lymphocytes T spécifiques à chaque antigène ont été effectuées en triplicata, tandis que les essais de survie ont été effectués sur une moyenne de 10 souris. Ainsi, il est possible que le SFU calculé pour ces antigènes ne reflète que la fréquence de lymphocytes T dans les souris pour lesquelles aucune réponse anti-tumorale n'a été observée. Il serait donc intéressant de quantifier le répertoire de lymphocytes T de souris immunisées avec ces antigènes lors d'essais de survie, au moment de leur décès et à la fin de la période de 100 jours, afin de comparer la fréquence du répertoire de lymphocytes T des souris qui répondent à l'immunisation à celle des souris qui ne répondent pas. Il est également intéressant de noter que la fréquence des lymphocytes T spécifiques à VNYIHRNV et VNYLHRNV (11 977 et 7 780) est très similaire à celle des lymphocytes T spécifiques à H3<sup>a</sup> et H13<sup>a</sup> (12 440 et 4 827) respectivement, bien que les réponses anti-tumorales des souris immunisées contre ces antigènes soient très différentes (**Tableau 6.2**). De façon très importante, la corrélation entre la fréquence des lymphocytes T antigène-spécifique et la survie globale des souris lorsque seuls les MiHA et les TAA sont considérés est nettement supérieure à celle considérant seulement les TSA (**Figure 3.4b** et **Figure supplémentaire 5.8c, pages 124 et 208**). Ainsi, des propriétés intrinsèques aux TSA semblent influencer leurs réponses anti-tumorales dans une mesure non-observée pour les MiHA et les TAA.

#### **6.1.4 Expression des antigènes dans les tissus périphériques et leur clonalité**

Pour mieux comprendre, au-delà des fréquences de lymphocytes T antigènes-spécifiques, ce qui différencie les réponses anti-tumorales induites par les différents types d'antigènes, nous avons évalué leur niveau d'expression en général dans les tissus et spécifiquement sur les cellules cancéreuses. D'abord, une analyse des données extraites depuis le consortium ENCODE<sup>21</sup> et l'Expression Atlas<sup>22</sup> nous a permis de valider qu'au niveau systémique, les patrons d'expression des gènes source de peptides sont très différents. D'abord, tel que reporté dans la littérature et dans notre laboratoire (**Résultats non publiés**), les MiHA sélectionnés sont tous exprimés de façon ubiquitaire dans les tissus de la souris C57BL/6<sup>8</sup>. De plus, puisqu'ils dérivent de transcrits normaux mais qu'ils sont surexprimés sur les cellules cancéreuses, l'expression des transcrits codant pour les TAA est également ubiquitaire (**Figure 5.2, page 182**). Finalement, les transcrits codant pour les TSA n'ont pas été détectés dans des tissus périphériques, à l'exception des ae-sTSA qui ont été détectés dans le placenta et quelques



sous-populations de thymocytes et de cellules thymiques. Néanmoins, puisque ces tissus représentent des sites immunitaires privilégiés ou qu'ils expriment très peu de molécules de classe I du CMH, les résultats de cette analyse démontrent que l'expression des TSA est restreinte aux cellules cancéreuses (**Figure 5.2, page 182**). Ainsi, nos travaux suggèrent que l'incapacité qu'ont les souris immunisées contre les TAA à rejeter des cellules EL4 et la faible fréquence de leur lymphocytes T antigène-spécifiques est liée au haut niveau d'expression des transcrits codant pour ces antigènes dans les tissus périphériques. Ces résultats sont appuyés par le fait que nous n'avons été en mesure d'isoler que très peu, voire pas du tout, de lymphocytes T dirigés contre les TAA par enrichissement de tétramers (**Figure 3.3a et b, page 123**), suggérant que ces derniers sont très peu avides pour leur cible. En effet, il est bien connu que seuls les TCR de moyenne à haute affinité pour le complexe pCMH peuvent être isolés grâce aux marquages par tétramers<sup>23-25</sup>. Ainsi, il semble que les lymphocytes T spécifiques à ces antigènes aient été éliminés de la circulation et que ceux restants sont peu avides pour leur cible<sup>26-28</sup>. En contrepartie, cette hypothèse est peu probable pour expliquer le potentiel anti-leucémique limité des ae-sTSA TVPLNHNTL et IILEFHSL, puisque ces derniers ne sont pas exprimés de façon ubiquitaire. Il est cependant important de soulever le fait que les données utilisées dans ce genre d'analyses proviennent de données de séquençage de tissus entiers qui comportent plusieurs sous-types cellulaires<sup>21</sup>. Ainsi, bien qu'improbable, il demeure possible que certaines de ces sous-populations cellulaires puissent exprimer les transcrits codant pour ces TSA et donc, que les ae-sTSA représenteraient réellement des TAA dont le transcrit est surexprimé dans les cellules cancéreuses.

Nous avons ensuite évalué leur niveau d'expression des antigènes spécifiquement sur les cellules cancéreuses. Puisqu'ils sont encodés par des gènes portant des mutations germinales, les MiHA peuvent être considérés comme étant clonaux, c'est-à-dire que leur expression est ubiquitaire sur les cellules cancéreuses. De même, puisque leur séquence antigénique est présentée à la fois sur les cellules saines et cancéreuses, les TAA qui dérivent de transcrits surexprimés dans les cellules cancéreuses peuvent également être considérés comme étant clonaux. En contrepartie, les cellules cancéreuses étant hautement hétérogènes, les altérations génétiques entraînant la génération de TSA peuvent être restreintes à une sous-population de cellules, créant ainsi des antigènes dits clonaux et sous-clonaux (exprimés sur une sous-

population de cellules cancéreuses)<sup>29,30</sup>. Pour évaluer l'impact de l'abondance des peptides à la surface des cellules EL4 sur la capacité qu'ont les lymphocytes T à les rejeter, nous avons effectué une quantification absolue de 3 antigènes, H7<sup>a</sup> et deux TAA (VAAANREVL et STLTYSRM), et avons déterminé que le MiHA H7<sup>a</sup> est 1.6 à 6.4 fois moins abondant à la surface cellulaire que les deux TAA (**Figure 3.5a, page 127**). Nous avons ensuite mesuré l'abondance des transcrits codant pour les différents TSA et avons déterminé que le ae-ereTSA VNYLHRNV représente un antigène clonal, tandis que les 4 autres TSA semblent sous-clonaux (**Figure 5.5, page 204**). Globalement, ces résultats suggèrent que l'immunogénicité, dans le cas d'antigènes clonaux, dépend davantage de la fréquence des lymphocytes T que de l'abondance des peptides à la surface cellulaire. De fait, les lymphocytes T spécifiques à VAAANREVL et STLTYSRM sont très peu nombreux après immunisation et ne peuvent, malgré la forte abondance de ces peptides à la surface des cellules EL4, entraîner le rejet des cellules leucémiques.

En contrepartie, l'immunogénicité des antigènes sous-clonaux semble dépendre à la fois de la fréquence des lymphocytes T antigène-spécifiques et de la fréquence de la population cellulaire exprimant les antigènes. En effet, il est proposé que l'intensité des réponses immunitaires dirigées contre des antigènes clonaux et sous-clonaux soit très différente<sup>29</sup> et les résultats obtenus pour les souris immunisées contre VNYIHRNV corroborent cette hypothèse. En effet, les fréquences de lymphocytes T spécifiques à H7<sup>a</sup> et H3<sup>a</sup> sont davantage similaires à celle des lymphocytes T spécifiques à VNYIHRNV qu'elles ne le sont pour VNYLHRNV. Néanmoins, les souris immunisées contre VNYIHRNV n'ont démontré que 20% de survie globale, comparativement au 100% de survie globale obtenus dans le cas des souris immunisées indépendamment contre les 3 autres antigènes (**Tableau 6.2**). Cette observation est d'autant plus intéressante que VNYIHRNV diffère de la version « sauvage » de l'épitope VNYLHRNV par un seul acide aminé (I/L à la quatrième position). Puisqu'il est possible que ce changement d'acide aminé affecte la force de l'interaction des lymphocytes T spécifiques à VNYIHRNV avec leur cible, nous avons mesuré l'avidité fonctionnelle des lymphocytes T antigène-spécifiques. Pour ce faire, nous avons calculé *in vitro* la dose d'antigène requise pour déclencher une réponse immunitaire<sup>14</sup> pour les lymphocytes T spécifiques à VNYIHRNV, VNYLHRNV, H3<sup>a</sup>, H7<sup>a</sup> et H13<sup>a</sup>. Nous avons ainsi déterminé que l'avidité fonctionnelle des lymphocytes T

spécifique à VNYIHRNV est bien au-delà de celle calculée pour H3<sup>a</sup> et H13<sup>a</sup>, et dans un ordre de grandeur similaire à celle calculée pour VNYLHRNV et H7<sup>a</sup> (**Tableau 6.2**). La caractéristique de VNYIHRNV qui le distingue du variant sauvage est donc que cet antigène est sous-clonal tandis que VNYLHRNV est clonal. Nos travaux supportent donc le fait que l'abondance des TSA à la surface cellulaire joue un rôle prédominant dans l'immunogénicité de ces antigènes<sup>29</sup> et pourrait être validée directement grâce à la transfection d'un vecteur forçant la présentation ubiquitaire de VNYIHRNV sur les cellules EL4. Ce faisant, il serait alors possible de comparer les réponses anti-leucémiques de lymphocytes T reconnaissant des cellules EL4 présentant le même antigène de façon clonale ou sous-clonale.

Bien qu'elles représentent un proxy de la clonalité des antigènes, ces analyses ont été effectuées sur la population globale des cellules EL4. Ainsi, elles ne nous permettent pas de distinguer une faible expression ubiquitaire d'une forte expression restreinte à un nombre limité de cellules. Néanmoins, les réponses anti-tumorales stochastiques observées pour les TSA pointent davantage vers la seconde hypothèse. De fait, il semble que les lymphocytes T reconnaissant spécifiquement VNYIHRNV ne sont en mesure d'éliminer que les cellules cancéreuses présentant cet antigène. Ainsi, dans le but de limiter les risques d'évasion tumorale ou d'immuno-édition, cibler un antigène clonal en contexte thérapeutique serait préférable<sup>29</sup>. Dans tous les cas, il serait tout de même intéressant d'évaluer la proportion réelle de cellules individuelles portant chaque TSA. Le séquençage de cellules unique est déjà utilisé pour mettre en évidence la phylogénie des cellules tumorales<sup>31,32</sup>. Néanmoins, d'un point de vue de priorisation des antigènes pour une utilisation thérapeutique, il est peu intéressant d'utiliser cette approche dans le but unique de valider l'expression de quelques séquences spécifiques. Il serait également intéressant de quantifier directement l'abondance des TSA à la surface des cellules EL4 grâce à la spectrométrie de masse. Tel que mentionné plus haut, la quantification absolue des peptides en spectrométrie de masse ne permet qu'une estimation du nombre de copies par cellules, faisant fi de la clonalité des antigènes. Des études visant à étudier le protéome de cellules individuelles par spectrométrie de masse ont déjà été effectuées<sup>33-35</sup>. Néanmoins, puisque le protéome est constitué d'environ 10<sup>4</sup> protéines d'une longueur moyenne de 449 acides aminés et que le répertoire de peptides associés aux molécules du CMH serait d'environ 10<sup>4</sup> peptides d'une longueur moyenne de 9 acides aminés, la masse nette de matériel obtenu par

les protéines cellulaires est nettement supérieur à celle des peptides extraits de la cavité des molécules du CMH I<sup>36-40</sup>. Considérant également la faible sensibilité qu'ont les appareils de MS pour l'identification de peptides présentés en faible abondance, cette approche semble, pour le moment, inappropriée pour les analyses de l'immunopeptidome de cellules unique. Néanmoins, la génération de clones de cellules EL4 individuelles pourrait permettre d'obtenir le matériel nécessaire pour d'évaluer plus précisément le répertoire d'antigènes spécifique à « chaque » cellules. De par les efforts investis pour générer une quantité de matériel suffisant pour analyser les antigènes les moins abondants, cette approche est davantage intéressante pour la validation des antigènes que pour l'analyse à grande échelle de l'immunopeptidome de cellules individuelles<sup>41</sup>. Finalement, une technique d'analyse par cytométrie en flux nommée FlowFish permet d'analyser des cellules ayant été marquées avec une amorce fluorescente synthétisée de façon à s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique choisie. Principalement utilisée pour l'analyse de la longueur des télomères, cette méthode représente une alternative intéressante aux analyses de cellules uniques, bien que pour l'instant, elle ne permet pas l'analyse des SNV ou des transcrits faiblement exprimés<sup>42</sup>.

### **6.1.5 Effet stochastique de l'immunisation**

Tel que mentionné précédemment, les réponses anti-tumorales générées contre les TSA semblent stochastique, contrairement à celles générées contre les MiHA et les TAA. Il est possible que la méthode d'immunisation sélectionnée dans notre modèle en soit la cause. La culture *ex vivo* de DC dérivée de la moelle osseuse représente un modèle largement utilisé dans la littérature pour l'immunisation des souris spécifiquement contre un antigène<sup>43-46</sup>. Néanmoins, il a récemment été démontré que cette approche permet le développement de DC provenant de précurseurs de cellules dendritiques et de précurseurs de monocytes<sup>47</sup>, ces derniers étant inefficaces pour migrer vers les OLS et demeurant principalement au site d'injection ou dans les ganglions afférents<sup>47-49</sup>. Ainsi, puisqu'une immunisation efficace contre un antigène requiert qu'un nombre suffisant de lymphocytes T rencontrent un nombre suffisant de cellules présentatrices d'antigènes, l'immunisation des souris avec des DC générées *ex vivo* dans un contexte où l'abondance des lymphocytes T antigène-spécifiques est limitée, peut entraîner des réponses anti-tumorales faibles et stochastiques. Ainsi, des voies alternatives d'immunisation pourraient être bénéfiques pour générer des réponses anti-TSA plus efficaces. Plusieurs

évidences montrent que l'infiltration d'une variété de cellules du système immunitaire dans l'environnement tumoral corrèle avec un pronostic favorable. Par exemple, l'infiltration de lymphocytes T cytotoxiques, de lymphocytes T de type T<sub>H1</sub> produisant de l'IFN $\gamma$ , de cellules NK ainsi que de cellules dendritiques et macrophages polarisés vers un phénotype de type 1, favorisent l'établissement de l'immunité anti-tumorale<sup>50,51</sup>. En contrepartie, la présence de lymphocytes T de type T<sub>H2</sub>, de MDSC, de T<sub>REG</sub> et de cellules dendritiques et macrophages polarisés vers un phénotype de type 2 seraient associés à un pronostic moins favorable<sup>50,51</sup>. Il a également été démontré que l'homologie des séquences antigéniques avec la séquence de peptides dérivant de maladies infectieuses corrèle avec un meilleur pronostic pour le patient<sup>52,53</sup>. Ainsi, il semblerait que la meilleure façon d'induire les réponses anti-tumorales serait de stimuler le système immunitaire en suivant les patrons d'activation observés lors de réponse dirigées contre un pathogène, en impliquant tant les effecteurs de l'immunité adaptative que ceux de l'immunité innée<sup>54,55</sup>.

Les lipoplexes-ARN permettent de générer des réponses immunitaires *in situ* en acheminant aux cellules présentatrices d'antigène, en combinaison à des agents stabilisateurs avec effet adjuvants, de l'ARN codant spécifiquement pour une séquence nucléotidique préalablement sélectionnée. Ce faisant, les lipoplexes-ARN activent les cellules dendritiques qui vont également capturer la séquence nucléotidique et l'apprêter pour la présenter à leur surface<sup>55</sup>. Les virus oncolytiques et les nanoparticules de type virales (VLP) quant à eux, représentent des vecteurs d'origine virale, qui peuvent ou non avoir un potentiel infectieux chez l'humain. Ces derniers peuvent éliminer directement les cellules cancéreuses, mais favorisent également l'activation des réponses immunitaires<sup>54,56,57</sup>. Ces vecteurs viraux peuvent être modifiés pour contenir, par exemple, des séquences permettant aux cellules infectées de sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Des virus ciblant spécifiquement des cellules cancéreuses sont présentement en développement<sup>57</sup> et un vaccin qui, lorsqu'injectés directement dans les lésions, exprime le GM-CSF et induit l'augmentation des réponses immunitaires, a été approuvé par la FDA pour le traitement du mélanome<sup>58,57</sup>. Dans tous les cas, le succès de ce genre de thérapie permet l'activation de récepteurs de reconnaissance de motif moléculaires, tel que le TLR7, sur les cellules dendritiques, puis permettra la sécrétion d'IFN de type I, polarisant la

réponse immunitaire vers une réponse de type 1 et favorisant ainsi les réponses anti-tumorales<sup>54,55,59</sup>.

Ainsi, l'utilisation de structures lipidiques encapsulant un ARN codant un antigène sélectionné (lipoplexes-ARN) et de virus oncolytiques ont démontré des effets bénéfiques lors de vaccinations dans des essais précliniques et cliniques et représentent des méthodes prometteuses pour délivrer des vaccins thérapeutiques<sup>55,57,58,60</sup>.

### **6.1.6 La nature de l'antigène : Un facteur dictant son immunogénicité?**

Jusqu'à présent, nos résultats ont démontré que la fréquence des lymphocytes T et la clonalité des antigènes jouent un rôle prédominant dans l'immunogénicité des différentes classes d'antigènes. Ces deux paramètres permettent d'expliquer les niveaux de survie des souris immunisées contre 12 des 13 antigènes. Le fait que l'un des antigènes les plus immunogènes (VNYLHRNV) dérive d'un ERE de séquence « normale » mais exprimé de façon aberrante dans les cellules EL4 est intrigant. En condition physiologique, l'expression des ERE est étroitement régulée et majoritairement réprimée par un processus de méthylation<sup>61,62</sup>. Ainsi, la tolérisation des lymphocytes T reconnaissant les antigènes dérivant de ces régions est probablement incomplète et ces derniers resteraient ignorants aux antigènes dérivant d'ERE<sup>62</sup>. En contrepartie, il a été démontré que la transformation néoplasique entraîne des altérations dans le paysage épigénétique des cellules cancéreuses<sup>62,63</sup>, menant à des événements d'hypométhylation, puis à la réexpression des ERE<sup>61</sup>. De plus, les ERE ayant été intégrés récemment dans le génome de l'organisme hôte, par exemple dans le cas du MMTV dans les souris C57BL/6, sont fortement méthylés dans les cellules saines mais sont également plus sujets à des événements d'hypométhylation lors de la transformation néoplasique<sup>62,63</sup>. Ainsi, la nature rétrovirale de ces antigènes, de même que la répression naturelle de leur expression dans les cellules saines en font des antigènes potentiellement hautement immunogènes et possédant un répertoire de lymphocytes T non-tolérés<sup>64</sup>. De fait, plusieurs travaux ayant démontré que des lymphocytes T reconnaissant ces antigènes sont capables d'induire de fortes réponses immunitaires, tant chez l'homme que chez la souris<sup>62,64-69</sup> supportent nos données démontrant qu'un antigène dérivant d'un ERE est fortement immunogène.

La nature de l'altération génétique portée par l'antigène peut également expliquer l'activité anti-tumorale des lymphocytes T dirigés contre VTPVYQHL, un antigène dérivant

d'une large délétion. En effet, nous avons dénombré une très faible quantité de lymphocytes T reconnaissant cet antigène suite à l'immunisation. De plus, les transcrits codant pour cet antigène sont très faiblement exprimés dans les cellules EL4. Néanmoins, les souris immunisées contre cet antigène ont une meilleure survie globale que celles immunisées contre 8 des 12 autres antigènes. Il a été proposé que l'amplitude des réponses immunitaires serait grandement influencé par le degré de différence entre la séquence dite « normale » et la séquence mutée. En effet, une séquence hautement mutée par rapport à la séquence normale permet aux lymphocytes T de voir les antigènes qui en découlent comme du « non-soi » plutôt que comme du « soi-altéré », augmentant ainsi les chances de stimuler un répertoire de lymphocyte T hautement avide. Ainsi, les antigènes dérivant de larges InDel et les réarrangements chromosomiques complexes tel que les fusions et les translocations, seraient plus immunogènes que celles dérivant de ns-SNV ou de petits InDel<sup>70,71</sup>.

En résumé, nos travaux démontrent que l'amplitude de la réponse anti-tumorale est influencée par divers critères, qui sont différents selon la nature de l'antigène. Pour les antigènes clonaux ciblés en contexte allogénique tels que les MiHA, la fréquence du répertoire de lymphocyte T et leur avidité fonctionnelle sont des paramètres principaux dictant la force de la réponse anti-tumorale. De façon intéressante, du fait que la taille du répertoire naïf des lymphocytes T influence grandement leur degré d'expansion et donc, leur niveau de réponse à un antigène (**Figures 5.4 et 5.7a , pages 187 et 207**)<sup>72-74</sup>, il serait possible d'utiliser ce paramètre pour la priorisation des antigènes en contexte clinique. En contrepartie, les réponses anti-tumorales générées par des lymphocytes T autologues sont plus nuancée. Pour ces antigènes, la fréquence du répertoire de lymphocyte T représente, dans la majorité des cas, une bonne indication du potentiel anti-tumorale. Néanmoins, la clonalité et la nature de l'altération génétique portée par l'antigène semblent également jouer un rôle très important pour dicter leur immunogénicité. Jusqu'à présent, l'identification d'un critère unique permettant de prédire de façon reproductible la force des réponses immunitaires n'a pas été possible<sup>18,75-80</sup>, témoignant de la grande complexité des réponses anti-tumorales et de leur nature contexte dépendante. Ainsi, la priorisation des antigènes pour l'immunothérapie du cancer devrait être multifactorielle et considérer la fréquence des lymphocytes T dans le répertoire naïf, la clonalité de l'antigène, le patron d'expression des transcrits codants pour l'antigène et la nature de l'altération génétique portée, critères qui peuvent tous être évalués dans un contexte clinique.

## 6.2 Quels sont les meilleurs antigènes à cibler pour l'immunothérapie du cancer?

Nos travaux nous ont permis de déterminer que, dans notre modèle expérimental, les TAA ne représentent pas de bonnes cibles pour l'immunothérapie du cancer, probablement dû à leur expression ubiquitaire. Il demeure possible que des TAA dont l'expression est restreinte à certains tissus et qui sont surexprimés dans les cellules cancéreuses, représentent des cibles immunogènes intéressantes pour les ACT. C'est le cas du facteur de transcription WT1, pour lequel des réponses immunitaires et anti-tumorales ont été observées dans des essais précliniques et cliniques<sup>81-84</sup>. Néanmoins, contrairement aux MiHA et aux TSA, le risque d'auto-immunité demeure important. De fait, puisqu'il demeure impossible de valider le niveau d'expression des antigènes dans chaque tissu et cellules qui les composent, la plupart des thérapies visant à augmenter artificiellement cette avidité ont entraîné des effets secondaires importants dans les patients<sup>85,86</sup>. De plus, il est possible que les lymphocytes T reconnaissant ces antigènes soient sujets à des mécanismes de tolérance. Bien que les résultats cliniques aient démontré que certains lymphocytes T persistent dans l'organisme et peuvent induire des réponses contre les TAA et les CTA, ces derniers pourraient être de moins grande avidité pour leur cible et donc, entraîner des réponses immunitaires faibles<sup>26,27</sup>. Il serait tout de même intéressant de déterminer si la tolérance centrale affecte les lymphocytes T reconnaissant tous les types de TAA et les TSA exprimés de façon aberrante et si oui, dans quelle mesure<sup>87</sup>.

Ainsi, étant perçus comme du « non-soi » par les lymphocytes T, les MiHA et les TSA représentent des cibles idéales pour l'immunothérapie du cancer. Puisque ces antigènes sont généralement utilisés dans des contextes thérapeutiques largement différents, peut-on conclure que les MiHA et les TSA sont équivalents d'un point de vue thérapeutique? À priori, nos travaux démontrent que les antigènes générant des fortes réponses anti-tumorales (H3<sup>a</sup>, H7<sup>a</sup> et VNYLHRNV) ont des caractéristiques similaires : ils sont clonaux et la fréquence de leur répertoire de lymphocytes T et leur avidité fonctionnelle est élevée. Cependant, dans la priorisation des antigènes à cibler pour les ATC antigènes-spécifiques, plusieurs autres facteurs sont à prendre en considération.



## 6.2.1 Les ATC antigène-spécifiques pour le traitement des cancers hématologiques et des tumeurs solides

Nos travaux ont été effectués dans le cadre d'un cancer hématologique, principal contexte d'étude des MiHA. Puisque ceux-ci sont exprimés sur toutes les cellules de l'individu, la réaction du greffon contre la leucémie est souvent observée en association avec une GVHD. De fait, si dans le cadre d'un transfert adoptif de lymphocytes T pour le traitement de cancer hématologiques, la GVL représente une GVHD restreinte aux cellules du compartiment hématopoïétique<sup>88</sup>, est-il possible de cibler des MiHA dans un contexte de tumeurs solides tout en évitant l'induction de réponses immunitaires contre les tissus sains? Des travaux chez la souris ayant mis en évidence que l'injection de lymphocytes T reconnaissant spécifiquement un MiHA pour le traitement d'une tumeur solide permet son élimination en absence de toxicité suggèrent que oui<sup>89</sup>. Un facteur important dans la spécificité de la réponse est l'expression de VLA-4 sur les lymphocytes T<sub>EFF</sub> reconnaissant la tumeur et l'expression de son ligand, Vcam-1, uniquement sur les néo-vaisseaux sanguins, permettant la migration des lymphocytes T spécifiquement vers la tumeur<sup>90-92</sup>. Plus de validations seront nécessaires chez l'humain afin de valider le potentiel thérapeutique de ces antigènes pour le traitement de tumeurs solides, mais ces travaux démontrent que l'utilisation de lymphocytes T spécifiques aux MiHA dans ce contexte est possible. Il serait donc intéressant de valider nos observations dans un contexte de tumeurs solide murin afin de comparer le potentiel anti-tumoral des MiHA et les TSA. Nous avons déjà testé notre approche protéogénomique sur la lignée cellulaire CT26, dérivant de souris Balb/c, et avons identifié 3 TSA dans nos analyses préliminaires, pour lesquels deux ont été localisées dans des régions codantes portant un SNV et un dérivant d'un ERE localisé dans une région cryptique. Néanmoins, l'haplotype du CMH des souris Balb/c ne nous permet pas de cibler des MiHA et d'effectuer une analyse comparative du potentiel anti-tumoral de nos 3 antigènes à celui de MiHA. Ainsi, puisque la lignée cellulaire MC-38, également un cancer colorectal, dérive de souris C57BL/6, il serait intéressant de comparer, avec cette lignée, le potentiel anti-tumoral des TSA et des MiHA dans un contexte de tumeur solide. Ce faisant, nous serions également en mesure de valider la sensibilité de notre approche protéogénomique, puisque certains TSA ont déjà été identifiés grâce à la MS sur ces cellules<sup>93</sup>.

## 6.2.2 Identifier une séquence, l'appliquer à plusieurs patients?

L'un des avantages des MiHA est que ces derniers peuvent être partagés par plusieurs patients. L'identification de variants alléliques communs dans la population permet donc le développement banques de donneurs pouvant être utilisés par un grand nombre de patients. Ainsi, l'utilisation de ces antigènes pour un ATC requiert certes l'identification de donneurs compatibles, mais pour lesquels les lymphocytes T peuvent être conservés et utilisés pour n'importe quel patient portant le bon haplotype HLA et le bon variant allélique<sup>94</sup>. Ce type d'approche antigène-spécifique mais non-spécifique à un patient a longtemps été perçu comme inaccessible pour les thérapies ciblant les TSA. Néanmoins, nos travaux ont permis d'identifier deux types d'antigènes qui proviennent de séquences pouvant être partagées par plusieurs patients. D'abord, les antigènes qui dérivent de ERE peuvent représenter des cible communes à plusieurs patients puisque ces séquences constituent 43% du génome humains<sup>62</sup> et qu'elles sont transmises entre les générations de façon Mendélienne<sup>95</sup>. Les antigènes qui dérivent de translocation sont également très intéressants puisqu'ils ont été rapportés dans plusieurs types de leucémies et certains types de cancers solides, tel que le rhabdomyosarcome alvéolaire, le sarcome d'Ewing, le cancer du rein et le carcinome cystique adénoïde de la grande salivaire. Parmi les quelques 10 000 translocations identifiées, environs 300 sont récurrentes, c'est-à-dire qu'elles sont présentes dans plus d'un individu. De fait, le chromosome Philadelphie (BCR-ABL), identifié d'abord dans les leucémies myéloïdes chroniques, est présent chez presque tous les patients atteints de ce type de cancer, en plus d'être présent chez certains patients atteints de leucémies lymphoblastiques aiguës et de leucémies myéloïde aiguës<sup>96,97</sup>. Il est donc intéressant de constater que des antigènes dérivant du produit de la fusion BCR-ABL ont été identifiés et sont capables d'induire des réponses immunitaires<sup>98-100</sup>. Ainsi, des approche antigène-spécifique mais non-spécifique à un patient peuvent être exploitées dans le cadre des ATC ciblant les MiHA, mais également les TSA.

## 6.2.3 Utilisation de lymphocytes T autologues ou allogéniques?

Découvrir les meilleurs antigènes à utiliser pour l'ATC ciblant spécifiquement un antigène, implique également d'aborder la question de l'utilisation de lymphocytes T autologues ou allogéniques. En effet, la priorisation de l'utilisation de lymphocytes T autologues pour

l'immunothérapie du cancer vient nécessairement contrecarrer l'utilisation de MiHA comme cible thérapeutique.

Il est intéressant de noter que dans le cas d'un AHCT, l'utilisation de cellules provenant d'un donneur syngénique, situation dans laquelle les antigènes tumoraux représentent les seules cibles potentielles des lymphocytes T du donneur, prévient l'établissement de l'effet GVL<sup>101</sup>. De plus, nos résultats ont démontré que l'injection de cellules EL4 dans des souris n'ayant pas été immunisées préalablement n'est pas suffisante pour provoquer l'expansion des lymphocytes T naïfs reconnaissant spécifiquement les antigènes identifiés et induire des réponses anti-tumorales, et ce, peu importe le niveau de présentation de l'antigène à la surface cellulaire (**Figure 5.5c, page 204**). Ceci est en contraste avec les résultats obtenus dans les souris B10.H7<sup>b</sup> non-immunisées, injectées avec les cellules EL4 (portant le variant « a »), pour lesquelles 60% de survie a été observé (**Figure 3.2, page 122**). Globalement, ces résultats suggèrent que les TSA seraient moins immunogènes que les MiHA et donc, que l'utilisation de lymphocytes T allogéniques ciblant les MiHA serait préférable. Néanmoins, considérant les performances observées lorsque les lymphocytes T sont préalablement activés, il est raisonnable de proposer que le potentiel anti-leucémique de lymphocytes T activés reconnaissant les MiHA est similaire à celui des lymphocytes T activés reconnaissant les TSA.

Plusieurs travaux utilisant les TIL ont démontré que l'expansion *ex vivo* de lymphocytes T autologues est possible et que le transfert de ces cellules a pu entraîner des régressions tumorales complètes dans 23% des patients atteints de mélanome métastatique<sup>102,103</sup>. Néanmoins, ces effets cliniques contrastent avec le taux de réponses anti-tumorales observées lors d'AHCT pour le traitement des cancers hématologiques<sup>104,105</sup>. Plusieurs évidences suggèrent que le plus faible taux de réponse observé lors d'ATC utilisant des TIL résulte de facteurs extrinsèques aux cellules plutôt que de la nature des cellules utilisées (autologue vs allogénique). D'une part, l'utilisation de lymphocytes T autologues peut être compromise par l'état de santé général du patient, qui aura potentiellement été sujet à des traitements conventionnels de chimiothérapie ayant altéré son répertoire de lymphocytes T<sup>88,106</sup>. Ensuite, les tumeurs utilisent plusieurs mécanismes pour échapper à la surveillance immunitaire, incluant l'immuno-édition. Par ce processus, les cellules cancéreuses présentant les antigènes les plus immunogènes peuvent déjà avoir été éliminées par les lymphocytes T présents dans la tumeur<sup>107-</sup>

<sup>110</sup>. Finalement, la génération d'une quantité suffisante de lymphocytes T pouvant être réinjectés au patient entraîne souvent l'induction d'un phénotype d'épuisement dans ces cellules. En effet, bien que la présence de lymphocytes T<sub>EFF</sub> dans les tumeurs corrèle avec un pronostic favorable<sup>111</sup>, cette population cellulaire est celle qui persiste le moins longtemps et possède le potentiel de prolifération le plus limité<sup>112</sup>. Plusieurs études ont démontré que les populations cellulaires de lymphocytes T offrant le plus de bénéfices lors d'un ATC sont les T<sub>CM</sub> et les T<sub>SCM</sub>, grâce à leur potentiel d'autorenouveau important ainsi qu'à leur capacité à générer des populations cellulaires plus différenciées telles que les T<sub>EM</sub> et les T<sub>EFF</sub><sup>113-115</sup>. Aujourd'hui, de nombreux essais cliniques utilisent des greffons à composition cellulaire mixte, sous prémisses que la présence de certaines cellules moins différenciées soit suffisante pour générer les effets anti-tumoraux désirés. Néanmoins, il a été démontré que la présence de sous-types cellulaires plus différenciés dans les cultures (T<sub>EM</sub>) favorise la différenciation prématurée des sous-types cellulaires moins différenciés (T naïfs), menant à une diminution des fonctions *in vivo*<sup>116</sup>. Ainsi, davantage d'études sont requises afin de mieux comprendre comment les conditions de culture *ex vivo* et la composition cellulaire des greffons affectent les réponses anti-tumorales et la persistance de ces cellules *in vivo* à long terme. Ainsi, une amélioration des méthodes entourant la génération de lymphocytes T autologues pourrait permettre l'établissement de réponses anti-tumorales similaires à celles observées lors de l'utilisation de lymphocytes T allogéniques reconnaissant les MiHA.

Considérant que, sur la base unique de l'antigène, les TSA et les MiHA ont le même potentiel anti-tumoral, l'utilisation de lymphocytes T autologues demeure, lorsque possible, une approche de choix puisqu'elle ne requiert pas l'identification de donneurs compatibles et limite ainsi les risques de toxicité. Basé sur ce raisonnement, l'utilisation de TSA pour l'ATC ciblant spécifiquement un antigène devrait être priorisée lorsque des antigènes immunogènes sont identifiés. Néanmoins, l'utilisation de lymphocytes T allogéniques peut représenter une alternative intéressante. De fait, dans ce cas, les cellules cancéreuses ne devraient pas avoir subi une pression sélective pour les antigènes qui sont reconnus par les lymphocytes T d'un donneur allogénique, ciblant potentiellement un répertoire antigénique différent de celui des lymphocytes T autologues. Une étude a d'ailleurs permis de démontrer que des lymphocytes T allogéniques peuvent reconnaître 20% des TSA prédits comme étant exprimés individuellement

sur 3 patients<sup>117</sup>. De plus, dans le cas des antigènes tumoraux, la sélection des donneurs est plus permissive qu'elle ne l'est dans le cas des MiHA puisque qu'elle ne requière que l'identification d'un donneur compatible tandis que les MiHA requièrent l'identification d'un donneur à la fois compatible et portant l'allèle variant de l'antigène<sup>117</sup>.

### **6.3 Le développement d'une approche protéogénomique permettant l'identification de tous les types d'antigènes**

L'identification par MS d'antigènes dérivant de séquences propres à l'individu requiert la génération d'une base de données qui devrait être la plus petite que possible<sup>118-121</sup>, mais qui devrait contenir toutes les séquences pouvant générer un antigène<sup>119,122</sup>. Ceci constitue un défi de taille puisque les bases de données comprenant des séquences normales et provenant des altérations génétiques, traduites dans les cadres de lecture canonique ou non-canonique peuvent facilement devenir très volumineuse. Ainsi, nous avons créé une approche par profilage de *k-mers* nous permettant de soustraire *in silico* les séquences dites normales d'un échantillon de cellules cancéreuses, afin d'en extraire la portion réellement cancer-spécifique. Cette approche de par sa sensibilité, permet d'extraire des séquences portant des altérations génétiques de n'importe quelle nature, en plus d'être applicable à n'importe quel échantillon de cellules cancéreuses, peu importe sa charge mutationnelle.

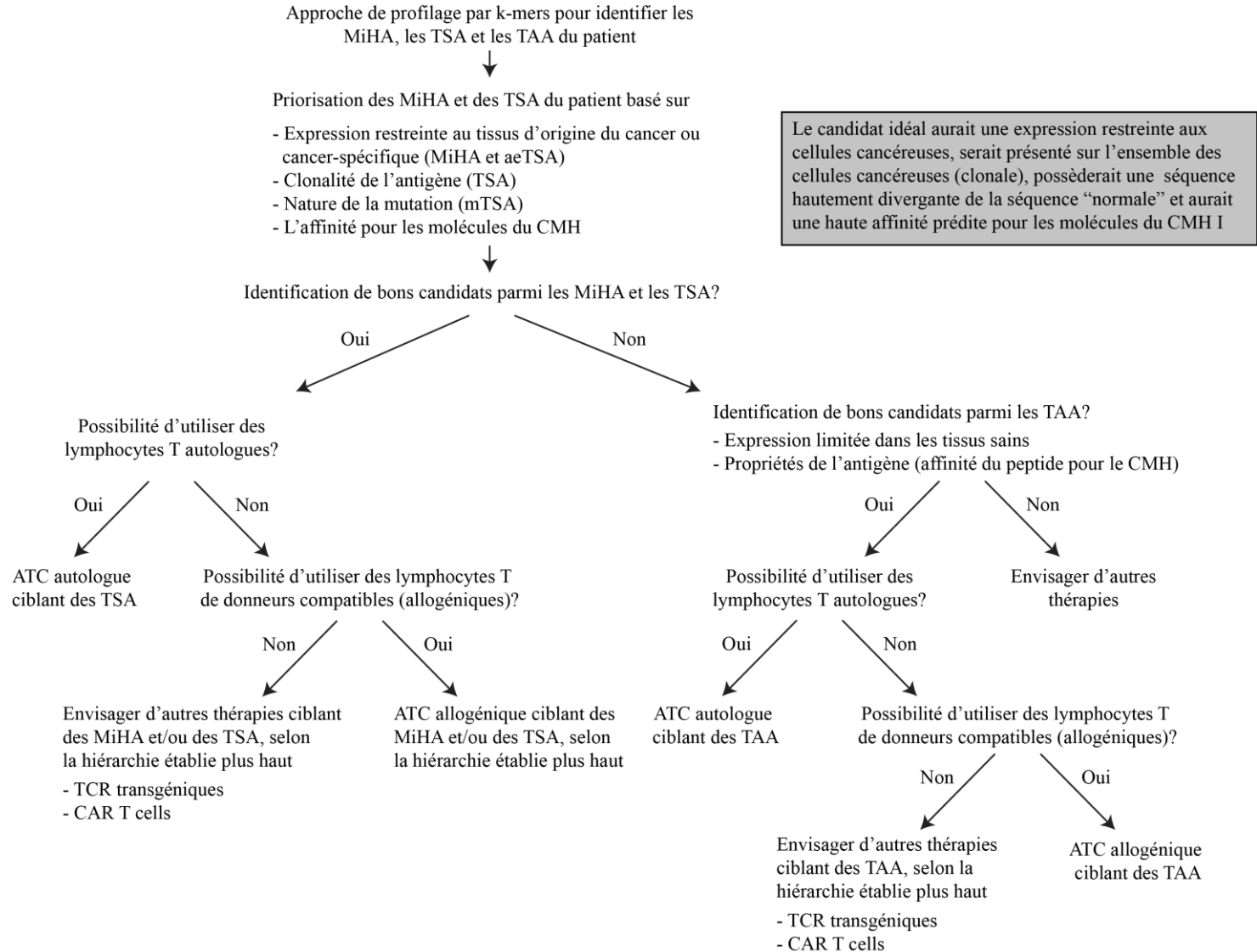
De par le fait que cette approche soit modulaire, il serait possible d'y intégrer n'importe quelles données de séquençage sur lesquelles filtrer les données pour identifier les TSA, mais également les TAA et les MiHA. Par exemple, il est estimé que 93,2 à 97,7% des polymorphismes génétiques d'un individu peuvent être identifiés grâce à la base de données de polymorphismes d'un seul nucléotide (dbSNP; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)<sup>123,124</sup>. Le fait d'utiliser les SNP reportées dans dbSNP pour filtrer les *k-mers* des cellules cancéreuses afin de ne conserver que ceux comportant des polymorphismes germinaux, permettrait l'identification à grande échelle de MiHA exprimés sur les cellules du patient dérivant de séquences conventionnelles et cryptiques, permettant ainsi d'élargir le spectre d'antigènes pouvant être ciblés pour l'immunothérapie du cancer.

L'un des résultats saillant de notre approche est le fait que, malgré la haute charge mutationnelle des cellules EL4, nous n'avons identifié que 5 TSA, tous d'origine cryptique.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce phénomène. D'abord, le fait que nous n'ayons identifié que des antigènes cryptiques sur les cellules EL4 est intéressant. Il est nécessaire de rappeler que notre approche est également en mesure d'identifier des antigènes dérivant de séquences canoniques, tel que démontré par l'identification de 2 antigènes mutés dans des régions codantes sur les cellules CT26 (**Données non-publiées**). Néanmoins, considérant que moins de 1% des mutations somatiques dans les cellules cancéreuses sont localisées dans les régions codantes<sup>125</sup>, il n'est pas surprenant qu'une majorité d'antigènes proviennent de régions dites « non-codantes ». Ensuite, la base de données générée suite à l'isolation des séquences cancer-spécifiques contient potentiellement deux fausses séquences pour chaque séquence réelle générée *in silico*. Ceci est dû au fait que nous avons utilisé des données de séquençage pour lesquelles l'information du brin codant était connu, mais dans lesquelles le cadre de lecture du transcrit ne l'était pas. Ainsi, afin d'intégrer dans notre base de données toutes les séquences cryptiques potentielles, nous avons effectué une traduction *in silico* dans 3 cadres de lecture. Il serait néanmoins possible d'effectuer un profilage de ribosomes afin d'obtenir l'information du cadre de lecture, permettant la génération d'une base de données encore plus spécifiques aux séquences exprimées par les cellules cancéreuses<sup>38,126</sup>. Finalement, il est possible que la faible quantité de TSA identifiés soit intrinsèque à la faible sensibilité des appareils de MS. En effet, les approches pour isoler les peptides depuis les cavités des molécules du CMH ne permettraient l'analyse que de 0,5 à 3% de l'ensemble des peptides présentés à la surface cellulaire<sup>127</sup>. Considérant que 80% des TSA que nous avons identifiés sont sous-clonaux, il demeure possible qu'une majorité des TSA soient en deçà du seuil de détection nécessaire pour leur identification par MS. De plus, nous avons utilisé l'élution douce à l'acide, une méthode couramment utilisée pour retirer les peptides de la cavité du CMH sur des cellules intactes. Néanmoins, cette méthode, puisque non-spécifique aux molécules du CMH, favorise l'intégration de 40 à 60% de contaminants dans l'échantillon peptidique<sup>7,128,129</sup>. De fait, le pouvoir de séquençage attribué aux antigènes réellement associés aux molécules du CMH peut être grandement diminué puisqu'également dirigé vers le séquençage de ces contaminants. L'utilisation de techniques d'immuno-précipitation des complexes pCMH est connue pour isoler des peptides de façon beaucoup plus spécifique que l'élution douce à l'acide. Ainsi, cette approche pourrait permettre d'augmenter la qualité des peptides séquencés par l'appareil de MS et par le fait même d'augmenter le nombre de peptides identifié<sup>41,129</sup>.

## 6.4 Conclusion et perspectives

L'objectif principal de cette thèse était de déterminer quels antigènes (MiHA, TAA ou TSA) représentent les meilleurs cibles pour l'immunothérapie du cancer. Nous avons tenté de répondre à cette question en mesurant la capacité qu'ont des lymphocytes T reconnaissant spécifiquement ces antigènes, reportés dans la littérature ou identifiés de novo et exprimés sur la lignée cellulaire lymphoblastique EL4, à induire des réponses anti-tumorales. D'abord, nous avons sélectionné des MiHA et des TAA rapportés dans la littérature, puis avons identifié tous les types de TSA présentés sur ces cellules grâce au développement d'une approche protéogénomique. De par cette approche expérimentale, dans laquelle la seule différence entre les différents types d'antigènes était la nature même de l'antigène, nous avons déterminé que les MAP (peptides associés aux molécules du CMH I) ayant le meilleur potentiel anti-tumoral sont ceux réellement perçus comme du « non-soi » par les lymphocytes T, c'est-à-dire les MiHA et certains TSA. De plus, nous avons identifié plusieurs critères dictant leur immunogénicité et qui peuvent permettre la priorisation de ces antigènes dans un contexte thérapeutique. Nos résultats démontrent que la réponse à la question « Quels sont les meilleurs antigènes à cibler pour l'immunothérapie du cancer » est très complexe et contextuelle. Nos travaux suggèrent que les MiHA et les TSA ont le même potentiel anti-tumoral, lorsque considérés uniquement sur la base de la séquence antigénique tel que perçu par les lymphocytes T. Puisque les thérapies ciblant les MiHA requièrent nécessairement l'identification de donneurs compatibles portant le variant du MiHA exprimé chez le receveur, l'utilisation de lymphocytes T autologues demeure, lorsque possible, une approche de choix. La figure 6.1 représente donc un résumé de mon interprétation des différentes conclusions tirées de nos analyses, sous la forme d'un arbre décisionnel quant au choix d'antigène à cibler pour l'ATC antigène-spécifique.



**Figure 6.1. Arbre décisionnel pour la priorisation des antigènes en contexte thérapeutique**



La translation de notre approche dans un contexte clinique devrait passer par l'acquisition de thymus provenant d'un nombre restreint de patients pour créer une base de données mTEC applicable à la population plutôt que personnalisée pour chaque patient. Des résultats préliminaires de séquençage de fragments de thymus humains congelés provenant de 6 individus en bas âge effectués dans notre laboratoire ont démontré, en concordance avec les données chez la souris, que près de 95% des gènes pouvant potentiellement coder pour des protéines sont détectés et exprimés dans les mTEC humaines<sup>130</sup>. Ainsi, l'utilisation de ces données de permettrait de couvrir l'amplitude de l'expression mosaïque de transcrits par les mTEC humaines.

Néanmoins, puisque la vaste majorité des SNP séquencés dans un individu sont partagés entre plusieurs individus de la même ethnicité<sup>131</sup>, ces données de séquençage sont certainement insuffisantes pour couvrir les polymorphismes génétiques pouvant être retrouvés dans l'ensemble de la population. Par conséquent, bien qu'elle soit très importante dans un modèle murin, la validation des séquences identifiées comme étant cancer-spécifique est cruciale chez l'humain. Deux approches non-mutuellement exclusives pourraient être utilisées afin de valider l'origine germinale ou somatique d'une mutation : l'utilisation de données de séquençage d'ADN provenant de cellules normales de l'individu ou l'utilisation d'une base de données tel que dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Il serait intéressant de comparer les approches utilisant dbSNP et le séquençage de cellules normales de chaque individu afin de déterminer le nombre de faux positifs qu'une utilisation unique de la base de données dbSNP pourrait ajouter dans les candidats identifiés. Un faible taux de faux positifs pourrait nous permettre d'éliminer l'étape de validation dans les cellules normales de l'individu et de se fier uniquement à la validation par dbSNP. L'inclusion d'une telle base de données dans notre approche permettrait également, tel que mentionné dans la thèse, d'identifier l'ensemble des polymorphismes chez l'individu, qu'ils soient germinaux ou somatiques, facilitant l'identification, à l'aide d'une seule approche, des MiHA et des TSA.

Finalement, la translation chez l'humain de notre approche, en intégrant des données de séquençage d'ADN normal ou la base de données dbSNP, requiert d'apporter des modifications afin de permettre de rapidement adresser la question de l'expression de transcrits codant pour les TSA exprimés de façon aberrante. Il est fait mention, dans le chapitre 5 (**Figure 5.2, page**

182), d'un filtre de validation utilisant les données extraites depuis ENCODE<sup>21</sup> et l'Expression Atlas<sup>22</sup>. La poursuite de nos travaux chez l'humain devra intégrer l'utilisation de ces données en tant que filtre principal des candidats, plutôt que simplement à des fins de validation subséquente.

Le défi principal de l'application en clinique de thérapies utilisant des lymphocytes T antigène-spécifiques demeure la validation de la présentation des antigènes à la surface des cellules cancéreuses et leur priorisation. Bien qu'il ait été démontré que des antigènes peuvent être isolés et séquencés par MS depuis des biopsies<sup>132</sup>, les antigènes plus faiblement présentés à la surface des cellules cancéreuses ne sont probablement pas identifiés<sup>127</sup>. Ainsi, l'utilisation en pratique clinique des approches d'identification d'antigènes par MS est plutôt improbable. De plus, les approches *in silico* d'identification et de priorisation d'antigènes utilisées présentement reposent sur la prédiction de l'affinité du peptide pour les molécules du CMH sans considérer le contexte de présentation antigénique et sont permissives à l'identification de nombreux faux positifs<sup>27,36</sup>. Les approches bioinformatiques permettant le contournement de l'étape d'identification des antigènes par MS ont un avenir intéressant. Déjà, l'utilisation d'un modèle de régression logistique sur des données de séquençage et plus de 25 000 MAP dérivant de 18 individus, a permis de prédire avec précision les gènes pouvant générer des MAP<sup>133</sup>. De plus, l'utilisation d'algorithmes plus complexes, les réseaux de neurone artificiels, ont permis de prédire des motifs moléculaires associés aux peptides identifiés par MS<sup>134,135</sup>. Il serait donc intéressant d'utiliser ce genre d'algorithmes pour identifier directement des antigènes pouvant être présentés à la surface des cellules cancéreuses depuis des données de séquençage d'ARN. D'autre part, les performances des algorithmes de prédiction permettant la priorisation *in silico* des antigènes identifiés pourraient être augmentées en intégrant, dans un modèle de régression logistique, divers critères dictant l'immunogénicité plutôt que seulement l'affinité de liaison du peptide pour les molécules du CMH.

La génération d'une grande quantité de données expérimentales de qualité est cruciale pour le développement d'algorithmes pouvant, de façon reproductible, prédire les séquences de peptides immunogènes présentés à la surface cellulaire. L'utilisation de notre approche protéogénomique permettant l'identification de tous les types d'antigènes présentés sur les cellules cancéreuses, contribuera à la compréhension des règles dictant le potentiel

thérapeutique des MiHA, TSA et TAA, tant en contexte de cancers hématologiques et de tumeurs solides, qu'en contexte d'ATC utilisant des lymphocytes T autologues et allogéniques, tout en permettant la génération en masse de données expérimentales qui faciliteront l'éducation des algorithmes de prédiction pour permettre leur utilisation en contexte clinique.

## 6.5 Références

1. Zuberi, A.R., Christianson, G.J., Mendoza, L.M., Shastri, N. & Roopenian, D.C. Positional cloning and molecular characterization of an immunodominant cytotoxic determinant of the mouse H3 minor histocompatibility complex. *Immunity* **9**, 687-698 (1998).
2. Eden, P.A., *et al.* Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6dom1) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J Immunol* **162**, 4502-4510 (1999).
3. McBride, K., *et al.* The model B6(dom1) minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast STT3 gene. *Immunogenetics* **54**, 562-569 (2002).
4. Mendoza, L.M., *et al.* Minors held by majors: the H13 minor histocompatibility locus defined as a peptide/MHC class I complex. *Immunity* **7**, 461-472 (1997).
5. Ostrov, D.A., *et al.* How H13 histocompatibility peptides differing by a single methyl group and lacking conventional MHC binding anchor motifs determine self-nonsel self discrimination. *J Immunol* **168**, 283-289 (2002).
6. Yadav, R., *et al.* The H4b minor histocompatibility antigen is caused by a combination of genetically determined and posttranslational modifications. *J Immunol* **170**, 5133-5142 (2003).
7. Fortier, M.H., *et al.* The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J Exp Med* **205**, 595-610 (2008).
8. Mori, S., El-Baki, H. & Mullen, C.A. Analysis of immunodominance among minor histocompatibility antigens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* **31**, 865-875 (2003).
9. Gulley, J.L., Madan, R.A. & Schlom, J. Impact of tumour volume on the potential efficacy of therapeutic vaccines. *Curr Oncol* **18**, e150-157 (2011).
10. Makkouk, A. & Weiner, G.J. Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer Res* **75**, 5-10 (2015).

11. den Haan, J.M., Arens, R. & van Zelm, M.C. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett* **162**, 103-112 (2014).
12. Kedzierska, K., La Gruta, N.L., Davenport, M.P., Turner, S.J. & Doherty, P.C. Contribution of T cell receptor affinity to overall avidity for virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11432-11437 (2005).
13. Kotturi, M.F., *et al.* Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the degree of epitope diversity shape CD8<sup>+</sup> T cell immunodominance. *J Immunol* **181**, 2124-2133 (2008).
14. Vigano, S., *et al.* Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? *Clin Dev Immunol* **2012**, 153863 (2012).
15. Karosiene, E., Lundegaard, C., Lund, O. & Nielsen, M. NetMHCcons: a consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions. *Immunogenetics* **64**, 177-186 (2012).
16. Andreatta, M. & Nielsen, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics* **32**, 511-517 (2016).
17. Paul, S., *et al.* HLA class I alleles are associated with peptide-binding repertoires of different size, affinity, and immunogenicity. *J Immunol* **191**, 5831-5839 (2013).
18. Sette, A., *et al.* The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* **153**, 5586-5592 (1994).
19. Fritsch, E.F., *et al.* HLA-binding properties of tumor neoepitopes in humans. *Cancer Immunol Res* **2**, 522-529 (2014).
20. van Buuren, M.M., Calis, J.J. & Schumacher, T.N. High sensitivity of cancer exome-based CD8 T cell neo-antigen identification. *Oncoimmunology* **3**, e28836 (2014).
21. Yue, F., *et al.* A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**, 355-364 (2014).

22. Barbosa-Morais, N.L., *et al.* The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science* **338**, 1587-1593 (2012).
23. Laugel, B., *et al.* Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties. *J Biol Chem* **282**, 23799-23810 (2007).
24. Stone, J.D., *et al.* Interaction of streptavidin-based peptide-MHC oligomers (tetramers) with cell-surface TCRs. *J Immunol* **187**, 6281-6290 (2011).
25. Davis, M.M., Altman, J.D. & Newell, E.W. Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis. *Nat Rev Immunol* **11**, 551-558 (2011).
26. Stone, J.D., Harris, D.T. & Kranz, D.M. TCR affinity for p/MHC formed by tumor antigens that are self-proteins: impact on efficacy and toxicity. *Curr Opin Immunol* **33**, 16-22 (2015).
27. Yarchoan, M., Johnson, B.A., 3rd, Lutz, E.R., Laheru, D.A. & Jaffee, E.M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* **17**, 209-222 (2017).
28. Alexander-Miller, M.A. High-avidity CD8<sup>+</sup> T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol Res* **31**, 13-24 (2005).
29. McGranahan, N., *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* **351**, 1463-1469 (2016).
30. Greaves, M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov* **5**, 806-820 (2015).
31. Nawy, T. Single-cell sequencing. *Nat Methods* **11**, 18 (2014).
32. Navin, N., *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**, 90-94 (2011).
33. Lombard-Banek, C., Moody, S.A. & Nemes, P. Single-Cell Mass Spectrometry for Discovery Proteomics: Quantifying Translational Cell Heterogeneity in the 16-Cell Frog (*Xenopus*) Embryo. *Angew Chem Int Ed Engl* **55**, 2454-2458 (2016).

34. Rubakhin, S.S., Churchill, J.D., Greenough, W.T. & Sweedler, J.V. Profiling signaling peptides in single mammalian cells using mass spectrometry. *Anal Chem* **78**, 7267-7272 (2006).
35. Rao, W., Pan, N. & Yang, Z. Applications of the Single-probe: Mass Spectrometry Imaging and Single Cell Analysis under Ambient Conditions. *J Vis Exp* (2016).
36. Bassani-Sternberg, M., *et al.* Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun* **7**, 13404 (2016).
37. Beck, M., *et al.* The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol* **7**, 549 (2011).
38. Laumont, C.M. & Perreault, C. Exploiting non-canonical translation to identify new targets for T cell-based cancer immunotherapy. *Cell Mol Life Sci* (2017).
39. Mester, G., Hoffmann, V. & Stevanovic, S. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1521-1532 (2011).
40. Nagaraj, N., *et al.* Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* **7**, 548 (2011).
41. Bassani-Sternberg, M. & Coukos, G. Mass spectrometry-based antigen discovery for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **41**, 9-17 (2016).
42. Baerlocher, G.M., Vulto, I., de Jong, G. & Lansdorp, P.M. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc* **1**, 2365-2376 (2006).
43. Mayordomo, J.I., *et al.* Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* **1**, 1297-1302 (1995).
44. Labeur, M.S., *et al.* Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* **162**, 168-175 (1999).

45. Mayordomo, J.I., *et al.* Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem Cells* **15**, 94-103 (1997).
46. Ashley, D.M., *et al.* Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* **186**, 1177-1182 (1997).
47. Helft, J., *et al.* GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* **42**, 1197-1211 (2015).
48. Guilliams, M. & Malissen, B. A Death Notice for In-Vitro-Generated GM-CSF Dendritic Cells? *Immunity* **42**, 988-990 (2015).
49. Wimmers, F., Schreibelt, G., Skold, A.E., Figdor, C.G. & De Vries, I.J. Paradigm Shift in Dendritic Cell-Based Immunotherapy: From *in vitro* Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets. *Front Immunol* **5**, 165 (2014).
50. Hendry, S., *et al.* Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol* **24**, 235-251 (2017).
51. Charoentong, P., *et al.* Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade. *Cell Rep* **18**, 248-262 (2017).
52. Snyder, A., *et al.* Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* **371**, 2189-2199 (2014).
53. Balachandran, V.P., *et al.* Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature* **551**, 512-516 (2017).
54. Lebel, M.E., Chartrand, K., Leclerc, D. & Lamarre, A. Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. *Vaccines (Basel)* **3**, 620-637 (2015).



55. Kranz, L.M., *et al.* Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **534**, 396-401 (2016).
56. Janelle, V., *et al.* The strength of the T cell response against a surrogate tumor antigen induced by oncolytic VSV therapy does not correlate with tumor control. *Mol Ther* **22**, 1198-1210 (2014).
57. Hamid, O., Hoffner, B., Gasal, E., Hong, J. & Carvajal, R.D. Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer. *Cancer Immunol Immunother* (2017).
58. Kaufman, H.L., *et al.* Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 718-730 (2010).
59. Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M.J. & Kroemer, G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* **15**, 405-414 (2015).
60. Guo, C., *et al.* Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res* **119**, 421-475 (2013).
61. Anwar, S.L., Wulaningsih, W. & Lehmann, U. Transposable Elements in Human Cancer: Causes and Consequences of Deregulation. *Int J Mol Sci* **18**(2017).
62. Kassiotis, G. & Stoye, J.P. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat Rev Immunol* **16**, 207-219 (2016).
63. Szpakowski, S., *et al.* Loss of epigenetic silencing in tumors preferentially affects primate-specific retroelements. *Gene* **448**, 151-167 (2009).
64. Sacha, J.B., *et al.* Vaccination with cancer- and HIV infection-associated endogenous retrotransposable elements is safe and immunogenic. *J Immunol* **189**, 1467-1479 (2012).
65. Kershaw, M.H., *et al.* Immunization against endogenous retroviral tumor-associated antigens. *Cancer Res* **61**, 7920-7924 (2001).

66. +6Malarkannan, S., Serwold, T., Nguyen, V., Sherman, L.A. & Shastri, N. The mouse mammary tumor virus env gene is the source of a CD8<sup>+</sup> T-cell-stimulating peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule in a murine thymoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13991-13996 (1996).
67. Huang, A.Y., *et al.* The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9730-9735 (1996).
68. Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., Boon, T. & Coulie, P.G. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* **62**, 5510-5516 (2002).
69. Takahashi, Y., *et al.* Regression of human kidney cancer following allogeneic stem cell transplantation is associated with recognition of an HERV-E antigen by T cells. *J Clin Invest* **118**, 1099-1109 (2008).
70. Capietto, A.H., Jhunjhunwala, S. & Delamarre, L. Characterizing neoantigens for personalized cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **46**, 58-65 (2017).
71. Turajlic, S., *et al.* Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. *Lancet Oncol* **18**, 1009-1021 (2017).
72. Kalia, V., *et al.* Prolonged interleukin-2 $\alpha$  expression on virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells favors terminal-effector differentiation *in vivo*. *Immunity* **32**, 91-103 (2010).
73. Pipkin, M.E., *et al.* Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* **32**, 79-90 (2010).
74. Williams, M.A. & Bevan, M.J. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* **25**, 171-192 (2007).
75. Assarsson, E., *et al.* A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection. *J Immunol* **178**, 7890-7901 (2007).

76. Crowe, S.R., *et al.* Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8+ T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections. *J Exp Med* **198**, 399-410 (2003).
77. Lazarski, C.A., *et al.* The kinetic stability of MHC class II:peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance. *Immunity* **23**, 29-40 (2005).
78. La Gruta, N.L., *et al.* A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 994-999 (2006).
79. Probst, H.C., *et al.* Immunodominance of an antiviral cytotoxic T cell response is shaped by the kinetics of viral protein expression. *J Immunol* **171**, 5415-5422 (2003).
80. McMahan, R.H., *et al.* Relating TCR-peptide-MHC affinity to immunogenicity for the design of tumor vaccines. *J Clin Invest* **116**, 2543-2551 (2006).
81. Chapuis, A.G., *et al.* Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med* **5**, 174ra127 (2013).
82. Cilloni, D., *et al.* Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* **16**, 2115-2121 (2002).
83. Keilholz, U., *et al.* A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* **113**, 6541-6548 (2009).
84. Oka, Y., *et al.* Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13885-13890 (2004).
85. Lu, Y.C. & Robbins, P.F. Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Semin Immunol* **28**, 22-27 (2016).
86. Melero, I., *et al.* Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 509-524 (2014).

87. Kelderman, S., *et al.* Antigen-specific TIL therapy for melanoma: A flexible platform for personalized cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* **46**, 1351-1360 (2016).
88. Vincent, K., Roy, D.C. & Perreault, C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood* **118**, 2951-2959 (2011).
89. Meunier, M.C., *et al.* T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med* **11**, 1222-1229 (2005).
90. Byrne, G.J., *et al.* Serum soluble vascular cell adhesion molecule-1: role as a surrogate marker of angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1329-1336 (2000).
91. Amatschek, S., *et al.* Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* **64**, 844-856 (2004).
92. Dienst, A., *et al.* Specific occlusion of murine and human tumor vasculature by VCAM-1-targeted recombinant fusion proteins. *J Natl Cancer Inst* **97**, 733-747 (2005).
93. Yang, J.C., *et al.* Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* **30**, 825-830 (2007).
94. O'Reilly, R.J., Prockop, S., Hasan, A.N., Koehne, G. & Doubrovina, E. Virus-specific T-cell banks for 'off the shelf' adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant* **51**, 1163-1172 (2016).
95. Nelson, P.N., *et al.* Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol Pathol* **56**, 11-18 (2003).
96. von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C. & Duyster, J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* **359**, 487-491 (2002).
97. Kurzrock, R., Gutterman, J.U. & Talpaz, M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **319**, 990-998 (1988).

98. Bosch, G.J., Joosten, A.M., Kessler, J.H., Melief, C.J. & Leeksa, O.C. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4<sup>+</sup> T cells elicited by primary *in vitro* immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* **88**, 3522-3527 (1996).
99. Makita, M., *et al.* Leukemia-associated fusion proteins, dek-can and bcr-abl, represent immunogenic HLA-DR-restricted epitopes recognized by fusion peptide-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Leukemia* **16**, 2400-2407 (2002).
100. Yotnda, P., *et al.* Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **101**, 2290-2296 (1998).
101. Vincent, K., *et al.* Rejection of leukemic cells requires antigen-specific T cells with high functional avidity. *Biol Blood Marrow Transplant* **20**, 37-45 (2014).
102. Tran, E., Robbins, P.F. & Rosenberg, S.A. 'Final common pathway' of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations. *Nat Immunol* **18**, 255-262 (2017).
103. Rosenberg, S.A., *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* **17**, 4550-4557 (2011).
104. Wingard, J.R., *et al.* Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* **29**, 2230-2239 (2011).
105. Abou-Mourad, Y.R., *et al.* Long-term outcome after allo-SCT: close follow-up on a large cohort treated with myeloablative regimens. *Bone Marrow Transplant* **45**, 295-302 (2010).
106. Hakim, F.T., *et al.* Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* **115**, 930-939 (2005).
107. Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565-1570 (2011).
108. Matsushita, H., *et al.* Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* **482**, 400-404 (2012).

109. Ribas, A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discov* **5**, 915-919 (2015).
110. Cali, B., Molon, B. & Viola, A. Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. *Open Biol* **7**(2017).
111. Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**, 298-306 (2012).
112. Caserta, S., Borger, J.G. & Zamoyska, R. Central and effector memory CD4 and CD8 T-cell responses to tumor-associated antigens. *Crit Rev Immunol* **32**, 97-126 (2012).
113. Geldres, C., Savoldo, B. & Dotti, G. Chimeric antigen receptor-redirected T cells return to the bench. *Semin Immunol* **28**, 3-9 (2016).
114. Barrett, D.M., Grupp, S.A. & June, C.H. Chimeric Antigen Receptor- and TCR-Modified T Cells Enter Main Street and Wall Street. *J Immunol* **195**, 755-761 (2015).
115. Klebanoff, C.A., Gattinoni, L. & Restifo, N.P. Sorting through subsets: which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *J Immunother* **35**, 651-660 (2012).
116. Klebanoff, C.A., *et al.* Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* **126**, 318-334 (2016).
117. Stronen, E., *et al.* Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. *Science* **352**, 1337-1341 (2016).
118. Nesvizhskii, A.I. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. *Nat Methods* **11**, 1114-1125 (2014).
119. Noble, W.S. Mass spectrometrists should search only for peptides they care about. *Nat Methods* **12**, 605-608 (2015).
120. Murphy, J.P., *et al.* MHC-I Ligand Discovery Using Targeted Database Searches of Mass Spectrometry Data: Implications for T-Cell Immunotherapies. *J Proteome Res* **16**, 1806-1816 (2017).

121. Nesvizhskii, A.I. A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. *J Proteomics* **73**, 2092-2123 (2010).
122. Sticker, A., Martens, L. & Clement, L. Mass spectrometrists should search for all peptides, but assess only the ones they care about. *Nat Methods* **14**, 643-644 (2017).
123. Sherry, S.T., *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* **29**, 308-311 (2001).
124. Granados, D.P., *et al.* Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat Commun* **5**, 3600 (2014).
125. Khurana, E., *et al.* Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nat Rev Genet* **17**, 93-108 (2016).
126. Crappe, J., *et al.* PROTEOFORMER: deep proteome coverage through ribosome profiling and MS integration. *Nucleic Acids Res* **43**, e29 (2015).
127. Hassan, C., *et al.* Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes. *J Proteomics* **109**, 240-244 (2014).
128. de Verteuil, D., *et al.* Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol Cell Proteomics* **9**, 2034-2047 (2010).
129. Caron, E., *et al.* Analysis of Major Histocompatibility Complex (MHC) Immunopeptidomes Using Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **14**, 3105-3117 (2015).
130. Takahama, Y., Ohigashi, I., Baik, S. & Anderson, G. Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat Rev Immunol* **17**, 295-305 (2017).
131. Shen, H., *et al.* Comprehensive characterization of human genome variation by high coverage whole-genome sequencing of forty four Caucasians. *PLoS One* **8**, e59494 (2013).

132. Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L.J. & Mann, M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics* **14**, 658-673 (2015).
133. Pearson, H., *et al.* MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J Clin Invest* **126**, 4690-4701 (2016).
134. Kind, T., *et al.* Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. *Mass Spectrom Rev* (2017).
135. Kanshin, E., Giguere, S., Jing, C., Tyers, M. & Thibault, P. Machine Learning of Global Phosphoproteomic Profiles Enables Discrimination of Direct versus Indirect Kinase Substrates. *Mol Cell Proteomics* **16**, 786-798 (2017).



# **Annexe I**

## **Article:**

**The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation**

## **Référence de publication:**

Mol Syst Biol. 2011 Sep 27;7:533.

# **AI.1 The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation**

Etienne Caron<sup>1,2,6</sup>, Krystal Vincent<sup>1,6</sup>, Marie-Hélène Fortier<sup>1,3,6</sup>, Jean-Philippe Laverdure<sup>1</sup>, Alexandre Bramoullé<sup>1</sup>, Marie-Pierre Hardy<sup>1</sup>, Grégory Voisin<sup>1</sup>, Philippe P Roux<sup>1,4</sup>, Sébastien Lemieux<sup>1,5</sup>, Pierre Thibault<sup>1,3,\*</sup> and Claude Perreault<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada,

<sup>4</sup> Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>5</sup> Department of Computer Science and Operations Research, Faculty of Arts and Sciences, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>6</sup> These authors contributed equally to this work.

## **CORRESPONDENCE:**

\* Correspondence: P Thibault or C Perreault, Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal

E-mail: pierre.thibault@umontreal.ca or

E-mail: claud.perreault@umontreal.ca

## **AI.2 Contribution des auteurs**

Conception du projet : Etienne Caron

Exécution des expériences : Marie-Hélène Fortier (Spectrométrie de masse), **Krystal Vincent** (Expériences pour les figures 1 et 7), Marie-Pierre hardy (Expériences pour la figure 7)

Analyse des données : Etienne Caron, Philippe Roux, Pierre Thibault et Claude Perreault

Analyses bioinformatiques : Jean-Philippe Laverdure, Alexandre Bramoullé, Grégory Voisin et Sébastien Lemieux

Génération des figures : Etienne Caron (1, 2, 3, 4, 5 et 6)

Écriture de la première version du manuscrit : Etienne Caron, Pierre Thibault et Claude Perreault

Tous les auteurs ont révisé la version finale du manuscrit

## **AI.3 Financial disclosure statement**

This study was funded by the Canadian Cancer Society Research Institute (grant # 701564).

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

## **AI.4 Abstract**

Self/non-self discrimination is a fundamental requirement of life. Endogenous peptides presented by major histocompatibility complex class I (MHC I) molecules represent the essence of self for CD8 T lymphocytes. These MHC I peptides (MIPs) are collectively referred to as the immunopeptidome. From a systems-level perspective, very little is known about the origin, composition and plasticity of the immunopeptidome. Here, we show that the immunopeptidome, and therefore the nature of the immune self, is plastic and molded by cellular metabolic activity. By using a quantitative high-throughput mass spectrometry-based approach, we found that altering cellular metabolism via the inhibition of the mammalian target of rapamycin results in dynamic changes in the cell surface MIPs landscape. Moreover, we provide systems-level evidence that the immunopeptidome projects at the cell surface a representation of biochemical networks and metabolic events regulated at multiple levels inside the cell. Our findings open up new perspectives in systems immunology and predictive biology. Indeed, predicting variations in the immunopeptidome in response to cell-intrinsic and –extrinsic factors could be relevant to the rational design of immunotherapeutic interventions.

## AI.5 Introduction

While unicellular eukaryotes primarily employ self/non-self discrimination to avoid self-mating, multicellular organisms use self/non-self discrimination primarily in immune defense (Boehm, 2006). Failure to respond to non-self can lead to death from infection whereas untoward response to self paves the way to autoimmunity. Peptides presented by major histocompatibility complex class I (MHC I) molecules represent the essence of self for CD8 T lymphocytes (Rammensee et al, 1993; Klein et al, 2009). These MHC I-associated peptides (MIPs) regulate all key events that occur during the lifetime of CD8 T cells in the thymus and the periphery (Goldrath and Bevan, 1999; Klein et al, 2009). MIPs are presented at the surface of most nucleated cells in jawed vertebrates and are collectively referred to as the MHC I immunopeptidome (Istrail et al, 2004).

Classic reductionist approaches have established the broad outlines of the MIP processing system and shown that MIPs derive from degradation of endogenous proteins by the proteasome and other peptidases (Yewdell et al, 2003; Hammer et al, 2007). They have also highlighted the complexity of the MIP repertoire. Thus, MHC I molecules present peptides encoded not only in the primary open reading frames but also those encoded in alternate reading frames (Starck and Shastri, 2011). Moreover, progresses in mass spectrometry (MS) have allowed increasingly sophisticated and comprehensive large-scale analyses of MIPs (Mester et al, 2011). Large-scale analyses have yielded unprecedented insights into the peptide specificities and motifs of MHC molecules and the diversity of the MIP repertoire (Hunt et al, 1992; Engelhard et al, 1993; Bonner et al, 2002; Weinzierl et al, 2008). They have also demonstrated that MIPs derive from all cell compartments and that the MIP repertoire can be modified by neoplastic transformation (Schirle et al, 2000; Hickman et al, 2004; Weinzierl et al, 2007; Fortier et al, 2008). Nevertheless, we still know very little about the genesis and molecular composition of the immunopeptidome: why do proteins such as STT3B yield abundant MIPs while others do not (Perreault, 2010)? MS studies have also revealed that the immunopeptidome is not a random sample of the proteome: many abundant proteins do not generate MIPs, while some low-abundance proteins generate large amounts of MIPs (Milner et al, 2006). Furthermore, large-scale analyses have yielded conflicting results on the relation between the transcriptome and the MIP repertoire (Weinzierl et al, 2007; Fortier et al, 2008; Mester et al, 2011). Therefore, further

systematic studies based on high-throughput technologies and integrative approaches are needed in order to elucidate the mechanisms that mould the immunopeptidome. In-depth mechanistic understanding of the immunopeptidome biogenesis would allow prediction of its molecular composition and would therefore be highly relevant to the development of immunotherapies (Zarling et al, 2006; Sette and Rappuoli, 2010).

A key unresolved question is whether the immunopeptidome of a particular cell is plastic and affected by its metabolic state. This issue is of fundamental importance because cells targeted by CD8 T lymphocytes (i.e. infected and neoplastic cells) are metabolically perturbed by intracellular parasite/viruses or various transforming events. We addressed this question by studying the immunopeptidome of a mouse lymphoma cell line (EL4) treated with the classic mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, rapamycin. We selected this model because rapamycin is an exquisitely specific inhibitor of the serine/threonine kinase mTOR, and because mTOR is a central regulator of cellular homeostasis through its involvement in promoting anabolic and inhibiting catabolic processes (Sengupta et al, 2010). Furthermore, mTOR signaling is regulated in numerous physiological and pathological conditions in all cell types, including neoplastic and immune cells (Araki et al, 2009; Caron et al, 2010; Sengupta et al, 2010).

## **AI.6 Materials and methods**

### ***Cell culture, flow cytometry and determination of cell size***

EL4 cell lines were cultured as previously reported (Fortier et al, 2008). Rapamycin, lactacystin and cycloheximide were purchased from Sigma-Aldrich. For MHC I labeling, cells were stained with anti-H2D<sup>b</sup> (B22–249.R1; Cedarlane), anti-H2K<sup>b</sup> (Y3; ATCC), anti-Qa2 (clone 1-1-2; BD Pharmingen), anti-QA1b (6A8.6F10.1A6) antibodies and analyzed on a BD LSR II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences) (Meunier et al, 2005). Cell number and cell size were measured by light microscopy using an Axio Imager microscope (Zeiss) and the Northern Eclipse software (Empix Imaging Inc.).

### ***Western blotting and isolation of polyubiquitinated proteins***

EL4 cells were harvested and lysed in RIPA buffer, samples were resolved by SDS–PAGE and immunoblotted with the following antibodies: ERAAP (gift from N Shastri, University of California, Berkeley, CA); Tapasin (gift from TH Hansen, Washington University School of Medicine, St Louis, MO); Lmp7, Lmp2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 5, ERp57, Sgk1,  $\beta$ 2m, PDI (Abcam); Calnexin, Calreticulin,  $\beta$ -actin (Sigma); PA28, S6K1, p-S6K1 (Thr-389), 4E-BP1, p-4E-BP1 (Ser-65), p-4E-BP1 (Thr-37/46),  $\alpha$ -tubulin, Rictor, Akt, p-Akt (S473), Ubiquitin (Cell Signaling); Myb (Upstate, Millipore); Mecl1,  $\beta$ 2 (Biomol International); Rfc2 (Proteintech Group, PTG); Tfdp2 (Proteintech Group, PTG); Pabpc1 (Cell Signaling); H2K<sup>b</sup>/H2D<sup>b</sup> (2G5; Thermo Scientific); Tap1, Tap2 (Santa Cruz Biotechnology). Isolation of polyubiquitinated proteins was achieved by using Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs) (LifeSensors, Inc.) according to the manufacturer's instruction.

### ***Metabolic radiolabeling***

To measure protein synthesis, EL4 cells were cultured in the absence or presence of rapamycin (20 ng/ml) for 0 h (ctrl), 6, 12, 24 and 48 h. During the last hour, cells were transferred to 96-well plates ( $0.5 \times 10^6$  cells/well, 12 replicates per conditions) and [<sup>3</sup>H]-leucine (10mCi/ml) (Perkin-Elmer) was added to each well. At the end of the culture period, cells were harvested with a Cell Harvester (Perkin-Elmer) on a fiber glass filter (Packard) for washing. Filters were dried for 24 h and 20 ml of scintillation liquid per well (MicroScint-O, Perkin-



Elmer) was added. Radioactivity incorporation was determined with the TopCount-NXT microplate scintillation and luminescence counter (Packard).

### ***Peptide extraction and MS analyses***

EL4 cells were treated with 20 ng/ml of rapamycin for 0, 6, 12, 24 and 48 h. MIPs were then isolated from EL4 cells as described previously using mild acid elution (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). Three biological replicates ( $5 \times 10^8$  EL4 cells per replicate) were prepared. MIPs obtained after acid elution were separated using an off-line 1100 series binary LC system (Agilent Technologies) to remove contaminating species. Peptides were loaded on a homemade strong cation exchange (SCX) column (0.3mm internal diameter x 50mm length) packed with SCX bulk material (Polysulfoethyl ATM, PolyLC). Peptides were fractionated with a gradient of 0–25% B after 25 min, 25–60% B after 35 min (solvent A=5 mmol/l ammonium formate, 15% acetonitrile, pH 3.0; solvent B=2 mol/l ammonium formate, 15% acetonitrile, pH 3.0). MIPs were collected in five consecutive fractions and brought to dryness using a speedvac. MIP fractions were resuspended in 2% aqueous acetonitrile (0.2% formic acid) and analyzed by nanoLC–MS/MS on a LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) (Fortier et al, 2008). Full mass spectra were acquired with the Orbitrap analyzer operated at a resolving power of 60 000 (at  $m/z$  400) and collision-activated dissociation tandem mass spectra were acquired in data-dependent mode with the quadrupole linear ion trap analyzer. Mass calibration used an internal lock mass (protonated  $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6$ ;  $m/z$  445.12057) and typically provided mass accuracy within 5 p.p.m. for all nanoLC–MS/MS experiments.

### ***MS/MS sequencing, hierarchical clustering and identification of MIP source proteins***

Peptidomic data were analyzed using Xcalibur software and peak lists were generated using Mascot distiller (version 2.1.1, <http://www.matrixscience.com>). Database searches were performed against the International Protein Index mouse database (version 3.23 containing 51 536 sequences and 24 497 860 residues) using Mascot (version 2.2, <http://www.matrixscience.com>) with a mass precursor tolerance of  $\pm 0.05$  Da and a fragment tolerance of  $\pm 0.5$  Da. Searches were performed without enzyme specificity and a variable modification of oxidized Met. All search results were filtered using an MHC motif filter based on the predicted mouse MHC I allele motifs (Supplementary Information). Raw data files were

converted to peptide maps comprising  $m/z$  values, charge state, retention time and intensity for all detected ions above a threshold of 10 000 counts using in-house software (Mass Sense) (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). Peptide maps were aligned and clustered together to profile the abundance of Mascot identified peptides using hierarchical clustering with criteria based on  $m/z$  and time tolerance ( $\pm 0.02 m/z$  and  $\pm 1$  min). This resulted in a list of non-redundant peptide clusters for all replicates of all samples to be compared. Peptides found in eluates from  $\beta 2m$  mutant EL4 cells were considered ‘contaminant peptides’. Subtraction of contaminant peptides eluted from untreated or rapamycin treated (for 48 h)  $\beta 2m$  EL4 cells allowed specific identification of genuine MIPs (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). MIPs were further inspected for mass accuracy and MS/MS spectra were validated manually. The Sidekick resource (<http://www.bioinfo.irc.ca/sidekick/Main>) was used to identify MIP source proteins. The list of MIPs reported in the present work has been provided to The Immune Epitope Database and Analysis Resource (<http://beta.immuneepitope.org/>) (Vita et al, 2010). MS/MS of all peptide identifications are available at <http://www.thibault.irc.ca/proteoconnections> (Courcelles et al, 2011) under the project name: MHC I immunopeptidome, and were submitted to the PRIDE database (Vizcaíno et al, 2010) under the accession numbers: 18855, 18856.

### ***MIP classification and abundance profiling***

Each MIP listed in Supplementary Tables A1.S1 and A1.S2 was classified according to restriction size and binding motif (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). The raw ratios for the time profiles of detected MIPs were then clustered using the TIGR MultiExperiment Viewer (TMEV) software. Hierarchical clustering with Euclidean distances and average linkage was used.

### ***Microarray analysis***

EL4 cells were treated or not with 20 ng/ml of rapamycin for 48 h. Three biological replicates were prepared. Total RNA was extracted from EL4 cells with TRIzol RNA reagent (Invitrogen) as instructed by the manufacturer. Samples were purified using DNase (Qiagen) and the RNeasy Mini kit (Qiagen), and the overall quality was analyzed with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Purified RNA (10 mg/sample) was hybridized on MM8 385K NimbleGen chips according to the manufacturer’s instruction. Arrays were scanned using

a GenePix4000B scanner (Axon Instruments) at 5 mm resolution. Data were extracted and normalized using the NimbleScan 2.4 extraction software (NimbleGen Systems). Further microarray analyses were performed using GeneSpring GX 7.3.1. The complete microarray data sets have been deposited in ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under accession number E-MEXP-3007.

### ***Isolation of total and polysomal RNA for quantitative real-time PCR***

EL4 cells were treated or not with 20 ng/ml of rapamycin for 48 h. Three biological replicates were prepared. Total RNA was extracted as described above. Polysomal RNA was extracted from  $2 \times 10^8$  EL4 cells as described previously (Rajasekhar et al, 2003). Gene expression level was determined using primer and probe sets from Universal ProbeLibrary (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>). Primer sequences are given in Supplementary Table AI.7. PCR reactions for 384-well plate format were performed as described in Baron et al (2007). All reactions were run in triplicate, and the mean values were used for quantification. The mouse Hprt1 and Tbp genes were used as endogenous controls for total RNA and polysomal RNA, respectively. In order to obtain an unbiased profile of the normalized ribosomal loading efficiencies for cells, we calculated the net polysomal mRNA to total mRNA ratios. Such data are presented in the manuscript as NPR (Rajasekhar et al, 2003).

### ***GO enrichment and connectivity score***

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resource (Peters and Sette, 2007) was used to identify significantly enriched GO terms associated to DEM source genes and DEGs from untreated and rapamycin-treated EL4 cells. To calculate connectivity scores between two lists of nodes (genes/proteins), computed scores from STRING (<http://string-db.org/>) (Szklarczyk et al, 2011) were used. By using computed scores in STRING, functional associations between two lists of nodes were integrated into an all-pairs-shortest-path distance matrix. Each functional association in the all-pairs-shortest-path matrix was transformed into a 'distance' (D), defined as  $-\ln(S)$ , where S is the computed STRING score. The all-pairs-shortest-path matrix contains the length of the shortest path (distance) between every pair of nodes in the network. A connectivity score was

then obtained by calculating the mean of the shortest path distance between every pair of nodes in a given matrix.

### ***STITCH network***

The 98 DEM source genes highlighted in Figure AI.3B were used to build the DEM network (Supplementary Figure AI.4). The 98 source genes encoding DEMs, the 171 DEGs classified within the enriched GO terms ( $P < 0.05$ ) in Supplementary Figure AI.3B and C and the mTOR network components in Supplementary Table AI.5 were used to build the global rapamycin-regulatory network. Subnetworks (Figure AI.5A) were manually extracted based on the modular organization of the total network (Hartwell et al, 1999; Rives and Galitski, 2003). Each of these molecules was individually searched in the STITCH (<http://stitch.embl.de/>) (Kuhn et al, 2010) database for its functional associations. The parameters used to elucidate the network were as follows: 40 additional nodes, a network depth=1, and interactions with a minimum STITCH combined score of 0.400. Functional associations identified for all of the molecules were then imported into Adobe Illustrator as a Scalable Vector Graphics image (action view configuration).

### ***In vitro cytotoxicity assay***

Bone marrow-derived DCs were generated as previously described (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). On day 9 of culture, peptides were added at a concentration of  $2 \times 10^6$  M and incubated with DCs for 3 h at 37°C. For mouse immunization,  $10^6$  peptide-pulsed DCs were injected i.v. in C57BL/6 females at day 0 and day 7. On day 14, splenocytes were harvested from the spleens of immunized mice and depleted of red blood cells using 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Cells were plated at  $5 \times 10^6$  cells/well in 24-well plates and restimulated with  $2 \times 10^6$  M peptide at 37°C. After 6 days, cytotoxicity was evaluated by a 4-h CFSE-based assay. The percentage of specific lysis was calculated as follows: (number of remaining CFSE<sup>+</sup> cells after incubation of target cells alone – number of remaining CFSE<sup>+</sup> cells after incubation with effector cells)/number of CFSE<sup>+</sup> cells after incubation of target cells alone x 100.

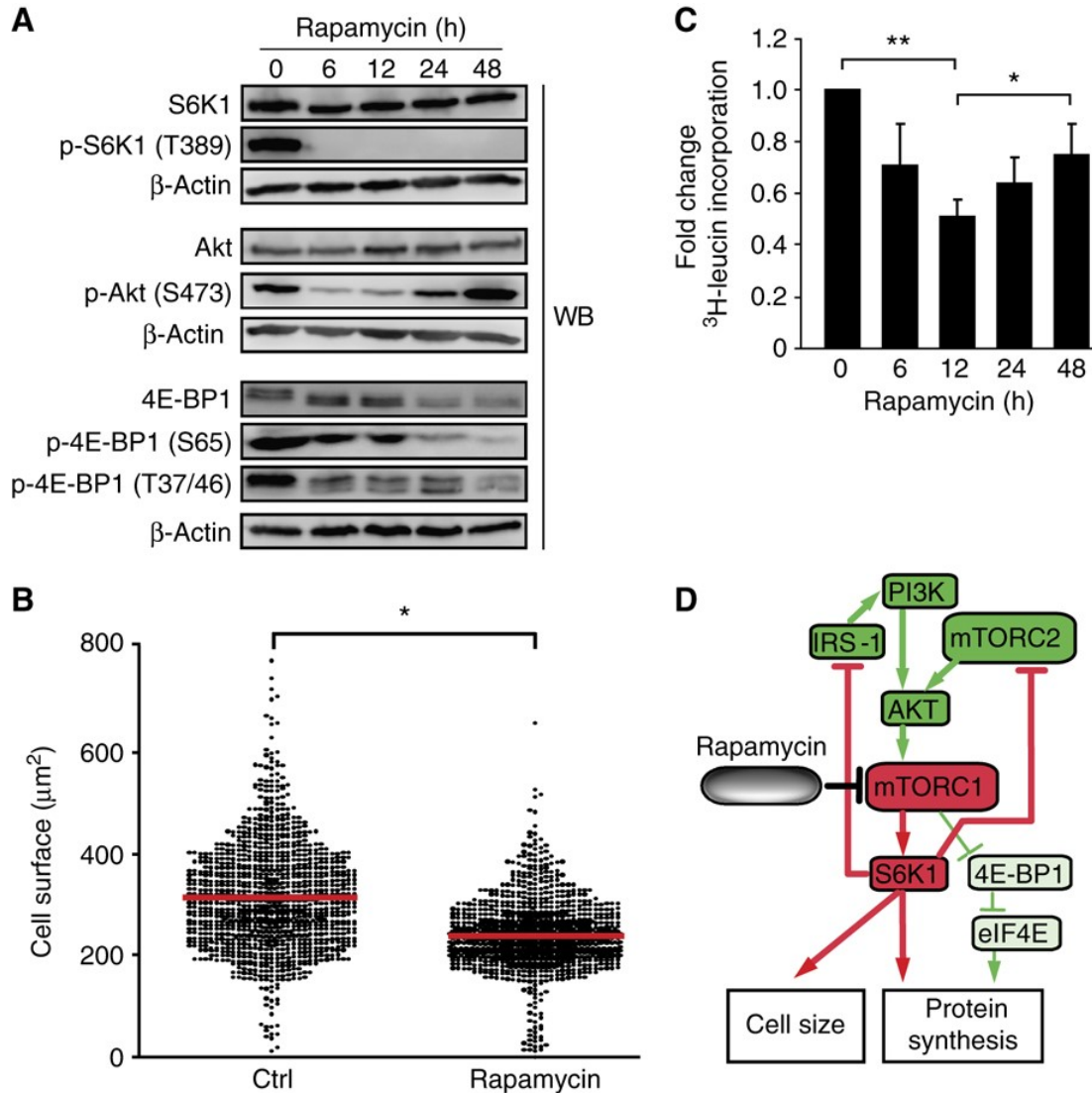
### ***Supplementary information***

Supplementary information is available at the Molecular Systems Biology website ([www.nature.com/msb](http://www.nature.com/msb)).

## AI.7 Results

### AI.7.1 The effect of rapamycin on mTOR signaling in EL4 cells.

As a prelude to our peptidomic studies, we first assessed the effects of rapamycin on EL4 cells. The first mTOR complex, mTORC1, phosphorylates both S6K1 and 4E-BP1 (Dowling et al, 2010). Recent studies have shown that rapamycin, previously thought to completely inhibit mTORC1 activity, differentially affects 4E-BP1 and S6K1 (Choo et al, 2008; Choo and Blenis, 2009; Thoreen et al, 2009). While rapamycin treatment completely and sustainably inhibits S6K1 activation, it partly and variably inhibits 4E-BP1 phosphorylation (Choo et al, 2008). To evaluate how rapamycin affected mTORC1 signaling in EL4 cells, we treated EL4 cells with rapamycin for different time durations up to 48 h. As expected, Thr-389 on S6K1 was fully dephosphorylated upon rapamycin treatment, correlating with a decrease in cell size (**Figure AI.1A and B**). In contrast, Ser-65 and Thr-37/46 on 4E-BP1 were partially dephosphorylated by rapamycin (**Figure AI.1A**). As previously reported, we also noted that abundance of 4E-BP1 was decreased after 24 h of rapamycin treatment (**Figure AI.1A**) (Dilling et al, 2002). Because 4E-BP1 is critically involved in cap-dependent translation via regulation of eIF4E, these results suggested that translation was maintained in EL4 cells in the presence of rapamycin. Accordingly, we observed that protein synthesis decreased during the first 12 h of rapamycin treatment, but progressively recovered thereafter (**Figure AI.1C**). Prolonged rapamycin treatment for up to 24 h has also been shown to inhibit the assembly of mTORC2, the second mTOR complex (Sarbasov et al, 2006). Here, we observed that mTORC2-mediated phosphorylation of AKT at Ser-473 was transiently decreased but recovered and was increased after treatment for 48 h. Thus, rapamycin treatment for 48 h inhibited mTORC1, but activated mTORC2 in EL4 cells. Collectively, these results showed that rapamycin-mediated mTORC1 inhibition perturbed protein synthesis and cell size by differentially inhibiting S6K1 and 4E-BP1 in EL4 cells (**Figure AI.1D**). Of direct relevance to our analyses of the MIP landscape, rapamycin treatment did not affect expression levels of key proteins involved in the MHC I antigen processing and presentation pathway (**Supplementary Figure AI.1**).



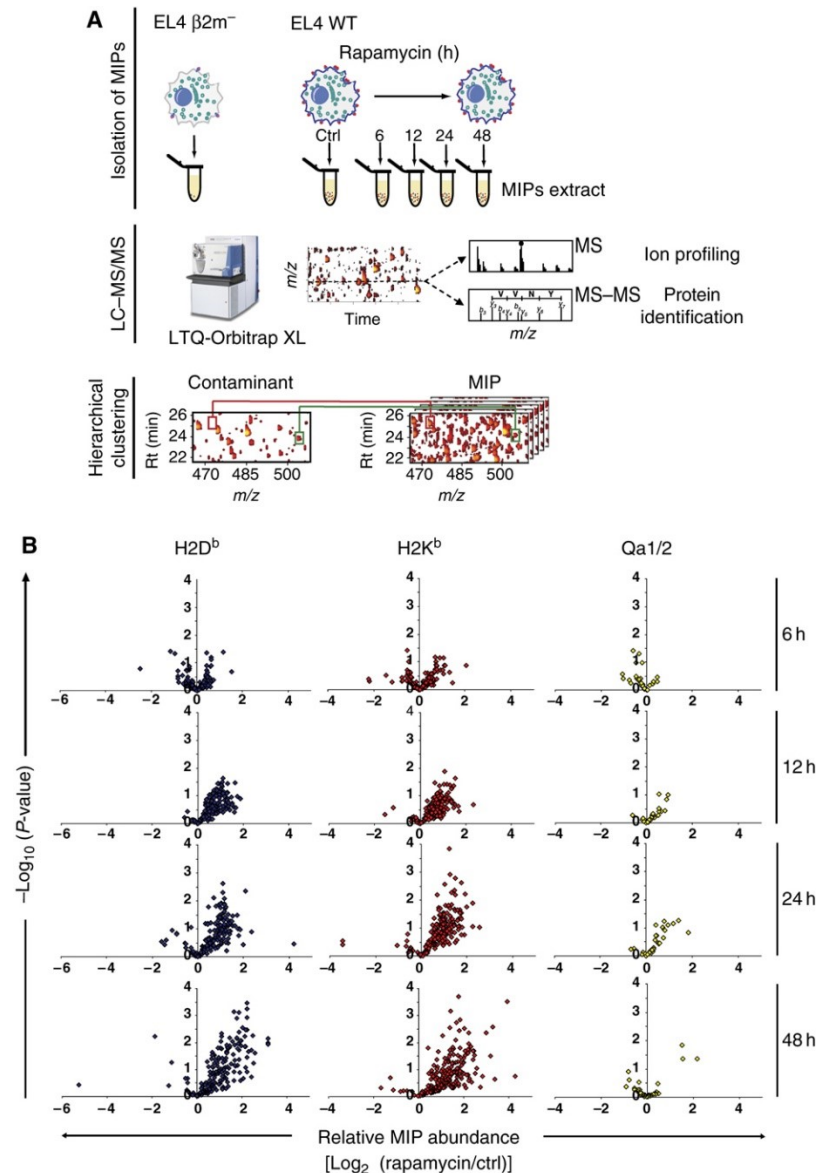
**Figure AI.1 Rapamycin differentially inhibits S6K1 versus 4E-BP1 in EL4 cells.** Cells were treated with 20 ng/ml of rapamycin for the indicated time periods. (A) Levels of the indicated proteins were determined by western blotting.  $\beta$ -Actin served as a loading control. Data are representative of three independent experiments. (B) EL4 cells were treated or not (ctrl) with rapamycin for 48 h. One thousand cells were counted for each condition. Cell size was measured by light microscopy. The red line corresponds to the average cell size. Data are representative of three independent experiments.  $*P < 0.0005$  (Student's *t*-test). (C) Relative protein synthesis was measured by [<sup>3</sup>H]-leucine incorporation. Data (mean $\pm$ s.d.) are representative of three independent experiments.  $*P < 0.01$ ,  $**P < 0.005$  (Student's *t*-test). (D) Model for effects of rapamycin-mediated mTORC1 inhibition in EL4 cells. Proteins and reactions were curated from the literature. Color code is based on the results in Figure AI.1 after 48 h of rapamycin treatment. Activation and inhibition of components/reactions

are depicted in green and red, respectively. Partial inactivation is represented by the thinner green lines.

## **AI.7.2 High-throughput MS-based studies unveil the plasticity of the immunopeptidome**

The plasticity of the immunopeptidome can only be estimated by systems-level analyses (Benoist et al, 2006; Germain et al, 2011), and MS with high accuracy analyzers is the most comprehensive and versatile tool in large-scale proteomics (Yates et al, 2009). We therefore used a high-throughput MS-based approach (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010) to profile in a time-sequential manner the abundance of MIPs presented by EL4 cells exposed to rapamycin for up to 48 h (**Figure AI.2A**; Supplementary Information). Subtraction of ‘contaminant peptides’ eluted from  $\beta$ 2m mutant EL4 cells allowed specific identification of genuine MIPs (Supplementary Table AI.1) (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). This resulted in identification and quantification of the relative abundance of 422 unique MIPs associated to different MHC I allelic products (**Figure AI.2B**; **Supplementary Table AI.2**). The salient finding was that the abundance of most peptides presented by classical MHC Ia molecules (H2D<sup>b</sup> and H2K<sup>b</sup>) increased over time after 12–48 h of rapamycin treatment (**Figure AI.2B**). In contrast, the abundance of most peptides associated to non-classical MHC Ib molecules (QAI and Qa2) was not augmented after treatment with rapamycin for 48 h. Accordingly, exposure to rapamycin led to an increase in cell surface levels of H2D<sup>b</sup> and H2K<sup>b</sup> but not QAI and Qa2 (**Supplementary Figure AI.2B**). Clustering analysis of the time-series data sets revealed that the abundance of numerous MIPs increased progressively in response to rapamycin (**Supplementary Figure AI.2A**). In general, the dynamic range of this response was modest with a median fold change in MIP abundance of 2.1 relative to untreated cells (calculated from supplementary Table AI.2). Nonetheless, a subset of 222 MIPs showed fold changes between 2 and 15, including 6 MIPs detected exclusively on rapamycin-treated cells (**Supplementary Table AI.2**). Perturbation of cellular metabolic activity with rapamycin therefore unveiled the plasticity of the immunopeptidome, by increasing both the abundance and the diversity of MIPs at the cell surface in a time-dependent manner.





**Figure AI.2 Rapamycin increases the abundance of MIPs presented by MHC Ia molecules.** (A) Experimental design for identification and relative quantification of MIPs. EL4 cells were incubated with 20 ng/ml of rapamycin for 0 h (ctrl), 6, 12, 24 and 48 h. Cells from all experimental conditions were harvested simultaneously. MIPs from rapamycin-treated and ctrl EL4 cells were isolated by mild acid elution and analyzed by nanoLC-MS-MS/MS. Heat maps displaying  $m/z$ , retention time and abundance were generated. A logarithmic intensity scale distinguishes between low (dark red) and high (bright yellow) abundance species. Analysis of  $\beta 2m^-$  mutant EL4 cells allows discrimination of genuine MIPs from contaminants (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). Examples of peptides that were differentially expressed (red line) or not (green line) between WT and  $\beta 2m^-$  mutant EL4 cells are highlighted in the boxes. (B) Volcano plots show the relative abundance of 416 H2<sup>b</sup>-associated peptides identified in three biological replicates at each time point. Six MIPs were detected uniquely after 48 h of rapamycin treatment.

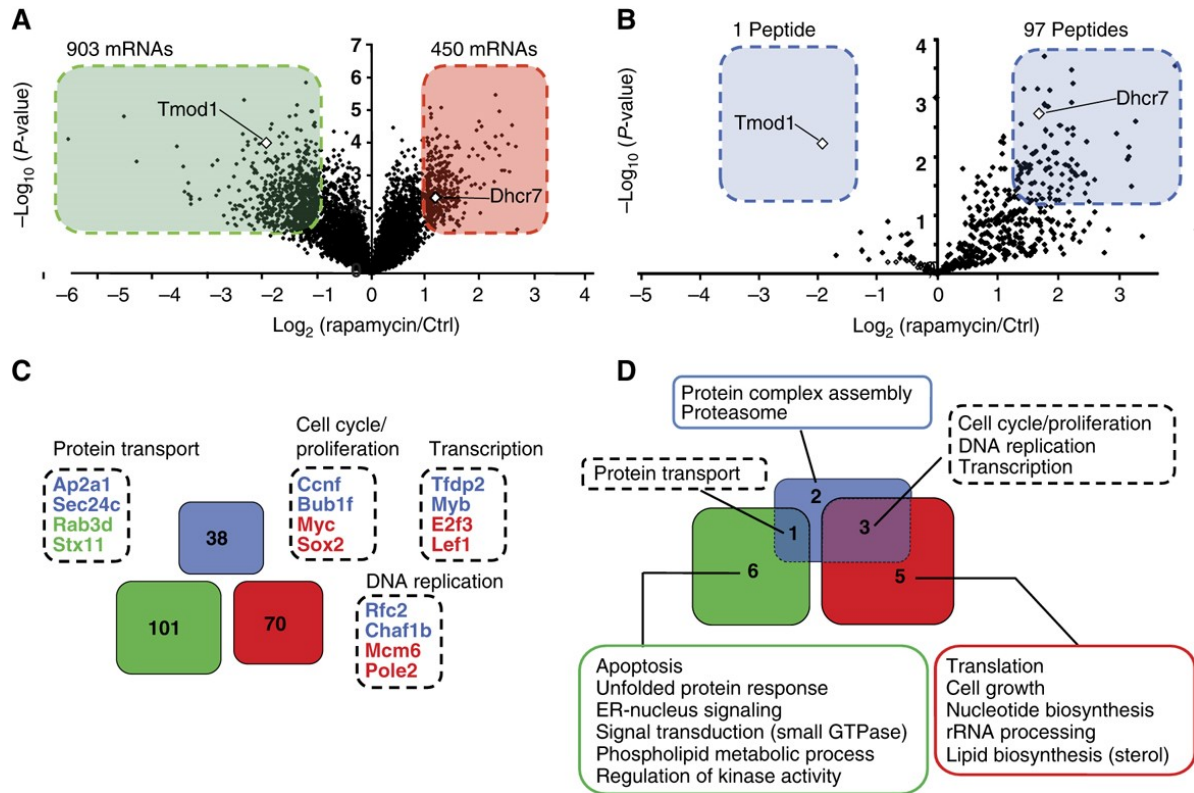
### **AI.7.3 mTOR inhibition induces functionally coherent changes in the transcriptome and the immunopeptidome**

Whether the immunopeptidome accurately projects intracellular metabolic changes to the cell surface is a fundamental question that has not been addressed yet. More precisely, we asked herein whether variations in the immunopeptidome reflected perturbations of rapamycin-sensitive metabolic processes regulated at the transcript level. To address this question, we first defined the impact of rapamycin on the transcriptome of EL4 cells. Using NimbleGen MM8 385K microarrays, we compared the transcriptome of untreated EL4 cells to that of EL4 cells treated with rapamycin for 48 h. A total of 1353 differentially expressed transcripts were identified (fold change >2.0;  $P < 0.05$ ), which represents about 3% of transcripts in EL4 cells (**Figure 3AI.A**). Among these, 903 and 450 mRNAs were under- and overexpressed, respectively. These genes are hereafter referred to as differentially expressed genes (DEGs). We next compared the 1353 DEGs with 98 unique source genes coding for the most differentially expressed MIPs (DEMs) (fold change >2.5;  $P < 0.05$ ; as described in Fortier et al, 2008) (**Figure AI.3B; Supplementary Table AI.2**). Based on microarray gene expression data, only two DEM source genes (*Tmod1* and *Dhcr7*) were found to be differentially expressed at the transcript level (**Figure AI.3A and B**). Interestingly, the only DEM that was less abundant was also found to be downregulated at the transcript level. Thus, these results indicate that only a minority of DEMs originate from DEGs.

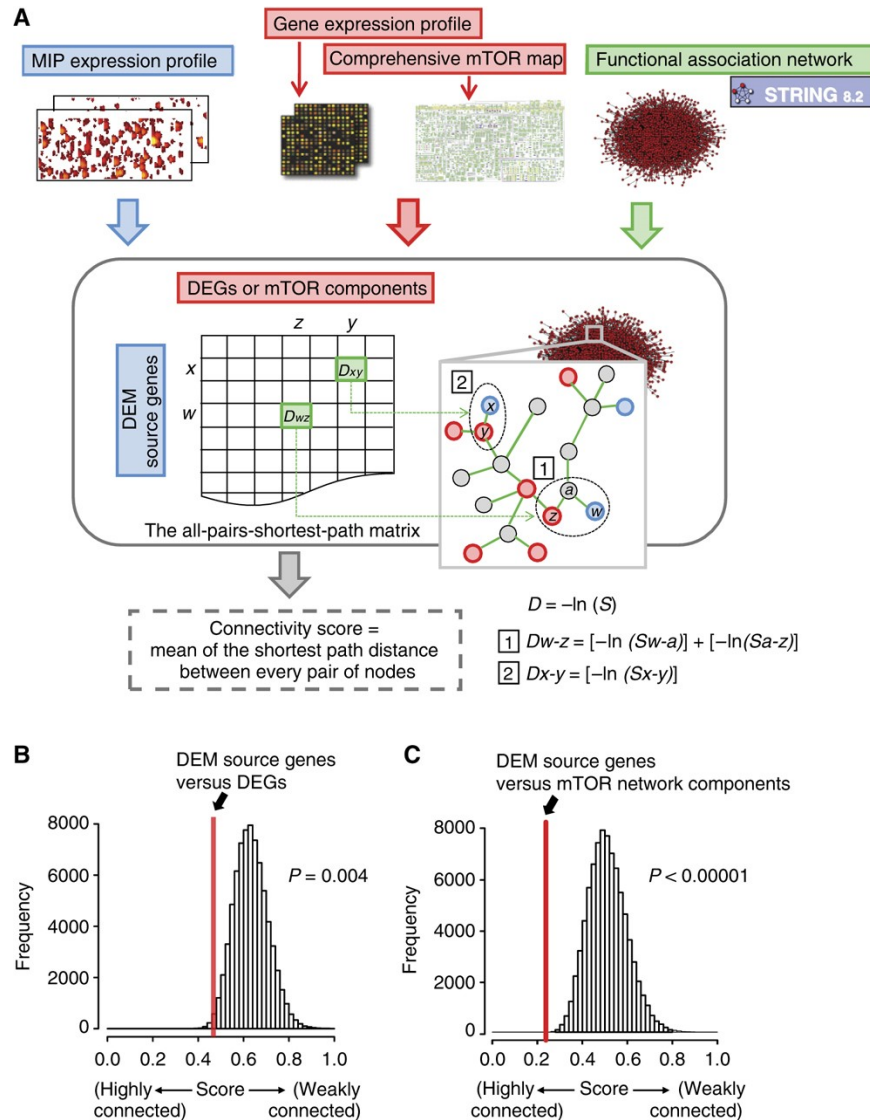
Analysis of Gene Ontology (GO) annotations revealed that 101 and 70 genes (**Figure AI.3C; Supplementary Figure AI.3B and C**) coding for under- and overexpressed mRNAs were associated to 7 and 8 (**Figure AI.3D**) significantly enriched cellular processes, respectively ( $P < 0.05$ ) (Supplementary Table AI.3). GO term analysis on the 98 DEM source genes also revealed a significant ( $P < 0.05$ ) enrichment for 6 cellular processes (**Figure AI.3D**) implicating 38 DEM source genes (Figure AI.3C; Supplementary Figure AI.3A; **Supplementary Table AI.3**). Analysis of DEGs and DEM source genes involved in enriched cellular processes yielded several findings. First, there was no overlap between the 171 DEGs and the 38 DEM source genes (**Figure AI.3C**). Second, cross-comparison of the overrepresented functional groups identified four distinct cellular processes (protein transport, cell cycle/proliferation, DNA

replication and transcription) that were enriched in both DEGs and DEM source genes (**Figure AI.3D**). In order to determine whether this result implies a significant functional relationship between transcriptome and immunopeptidome variations, we developed an all-pairs-shortest-path matrix, which scores the functional connectivity between two lists of genes (**Figure AI.4A**).

Using this matrix, we first calculated a connectivity score between the 171 DEGs and the 38 DEM source genes identified above. Then, bootstrapping was used as a statistical sampling method to calculate control connectivity scores from 105 sets of 38 randomly selected MIP source genes from a database of 891 unique source genes encoding H2<sup>b</sup>-associated peptides (**Supplementary Table AI.4**). These analyses revealed that the 38 DEM source genes were tightly interconnected to the 171 DEGs (bootstrapping;  $P=0.004$ ) (**Figure AI.4B**). Hence, while most DEMs did not originate directly from DEGs, they do originate from genes that are tightly functionally connected to DEGs. In other words, this systems level analysis demonstrates that rapamycin-mediated mTOR inhibition induces functionally coherent changes in the transcriptome and the immunopeptidome. Given the tremendous complexity of the transcriptome, this finding suggests that the immunopeptidome of the cell is more complex than anticipated and that its plasticity might be extensive.



**Figure A1.3 Rapamycin-mediated mTOR inhibition induces functionally coherent changes in the transcriptome and the immunopeptidome.** (A) Volcano plot representation of the relative abundance of 42 586 transcripts after 48 h of rapamycin treatment. Transcripts were considered to be differentially expressed when the fold difference in abundance was  $>2.0$  ( $P < 0.05$ ). Transcripts over- and underexpressed in rapamycin-treated cells relative to ctrl cells are depicted in the red and green boxes, respectively. (B) Volcano plot representation of the relative abundance of 422 MIPs after 48 h of rapamycin treatment. MIPs that were the most differentially expressed (fold difference relative to untreated cells  $>2.5$ ;  $P < 0.05$ ; fold difference and  $P$ -value based on Fortier et al, 2008) are highlighted in the blue boxes. (C,D) GO enrichment analyses were performed for DEM source genes and DEGs. In all, 38 DEM source genes (blue) were associated to 6 significantly enriched cellular processes. In all, 101 (green) and 70 (red) genes coding for under- and overexpressed mRNAs were associated to 7 and 8 significantly enriched cellular processes, respectively. (C) Venn diagram showing no overlap between DEM source genes and DEGs. Dashed boxes show representative genes that contributed to enrichment of four cellular processes in both DEM source genes and DEGs. (D) Venn diagram showing functional overlap between cellular processes overrepresented in DEM source genes and DEGs. The four cellular processes overrepresented in both DEM source genes and DEGs are listed in the dashed boxes.



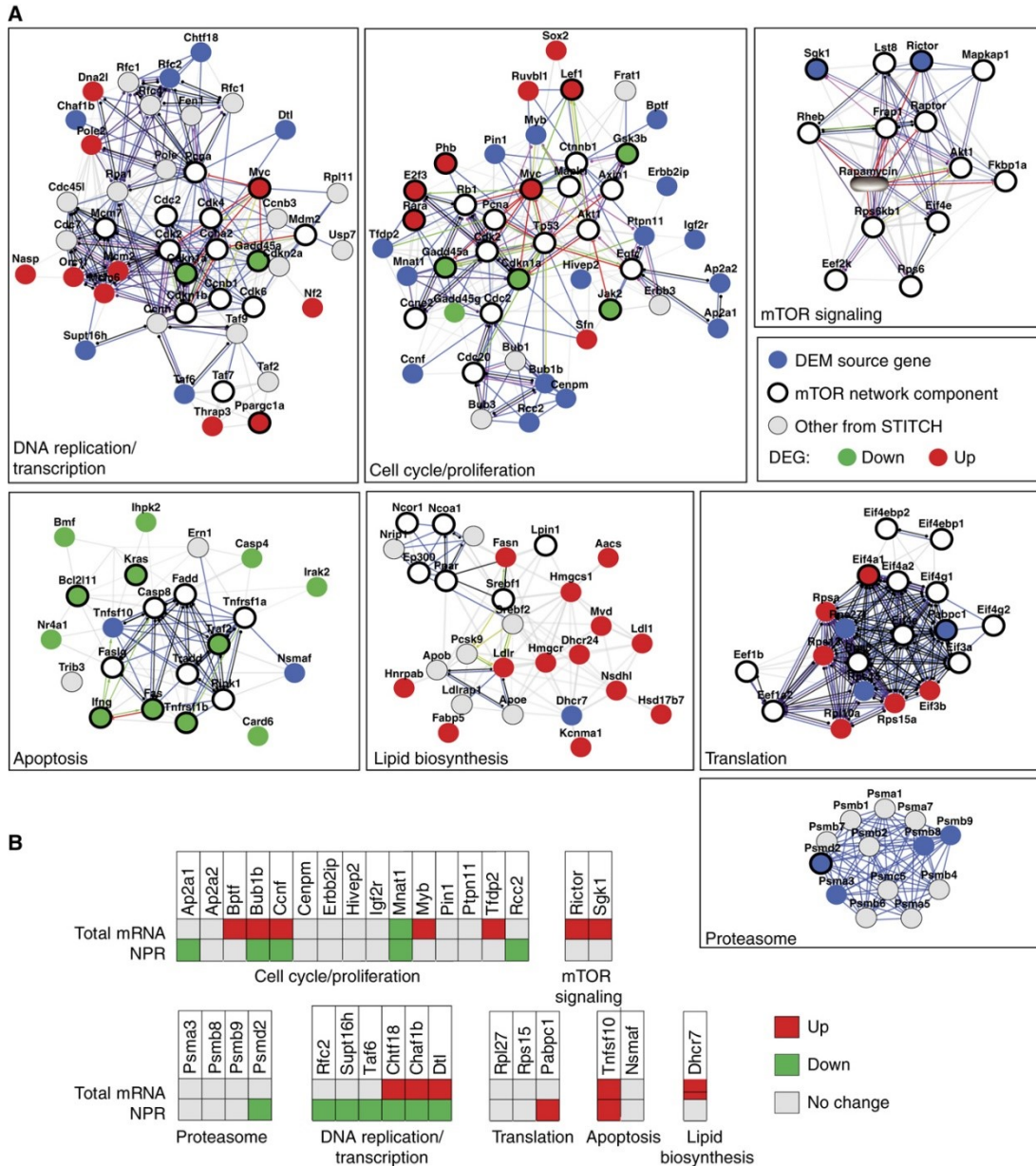
**Figure A1.4 DEM source genes are tightly connected to transcriptomic changes and the mTOR network.** A) An all-pairs-shortest-path matrix was developed by using computed scores ( $S$ ) in the STRING database (<http://string-db.org/>). The all-pairs-shortest-path matrix was used to calculate functional associations between (1) DEM source genes and DEGs and (2) DEM source genes and mTOR network components. Each functional association in the all-pairs-shortest-path matrix was transformed into a distance ( $D$ ). The matrix shows DEM source genes (rows), DEGs or mTOR network components (columns), and the shortest path distance between every pair of nodes (genes/proteins) in the association network (e.g.  $D_{w-z}$  and  $D_{x-y}$ ). A connectivity score corresponds to the mean of the shortest path distance between every pair of nodes in a given matrix. (B, C) The all-pairs-shortest-path matrix was used to calculate functional connectivity scores. The red lines represent the connectivity score between DEM source genes and DEGs (B), and between DEM source genes and mTOR network components (C). A bootstrap procedure was used to calculate control connectivity scores represented by the Gaussian distributions.

## AI.7.4 DEMs arise from biochemical networks connected to mTOR

The above results suggested that DEMs originated from genes connected to the mTOR network. However, considering that mTOR has a pervasive role in protein synthesis and degradation (Caron et al, 2010), we could not discard the possibility that DEMs originated from some non-specific generic effect of rapamycin on protein metabolism. In the latter case, DEM-coding genes would not be tightly connected to the mTOR network. Hence, in order to further evaluate the relationship between DEMs and mTOR, we first conducted an analysis on the 98 DEM source genes (**Figure AI.3B; Supplementary Table AI.2**) using the interaction network database STITCH (Kuhn et al, 2010). This analysis uncovered a network containing 30 DEM source genes that were interconnected and organized within discrete functional modules (**Supplementary Figure AI.4**). Strikingly, the network included the chemicals rapamycin and everolimus (rapamycin analog) in addition to components (e.g. Rictor, Sgk1) and modules (e.g. mTOR signaling, translation, lipid biosynthesis) known to be directly regulated by mTOR (Caron et al, 2010). Therefore, we reasoned that rapamycin-mediated changes in the immunopeptidome might originate from genes that are very closely connected to components of the mTOR signaling network. To systematically evaluate this assumption, we measured the connectivity score between the 30 DEM source genes and components extracted from a comprehensive map of the mTOR interactome and signaling network (**Supplementary Table AI.5** based on Caron et al, 2010). By using the all-pair-shortest-path matrix described above, we calculated that the 30 DEM source genes were strongly interconnected to the mTOR network components relative to random assignments (bootstrapping;  $P < 10^{-5}$ ) (**Figure AI.4C**). This systems-level analysis demonstrates that a substantial fraction of rapamycin-induced variations in the immunopeptidome arise from biochemical networks whose components are highly connected to the target of rapamycin (i.e. mTOR). Thus, our data reinforce the notion that the immunopeptidome projects a functional representation of intracellular metabolic changes to the cell surface. Further immunopeptidomic studies are needed to evaluate whether the mTOR network regulates the repertoire of MIPs in other contexts.

To visualize the organization of relationships between DEM source genes, the transcriptome and the mTOR network, we integrated in a global network the mTOR interactome and signaling network (Supplementary Table AI.5 based on Caron et al, 2010), the 98 DEM source genes (**Figure AI.3B; Supplementary Table AI.2**) and the 171 DEGs (**Figure AI.3C; Supplementary Figure AI.3B and C**). We found that 33 DEM source genes were constituents of 7 discrete functional subnetworks (**Figure AI.5A**). All modules included components of the mTOR network. Integration of microarray data revealed that DEGs were found in 5 out of the 7 modules containing DEM source genes. Notably, two modules contained DEM source genes but no DEGs: the proteasome and the core mTOR signaling modules. Overall, 82% of the DEM source genes (27/33) were localized within subnetworks transcriptionally regulated by DEGs. Collectively, these data indicate that rapamycin-induced variations in the immunopeptidome arise mostly from transcriptionally perturbed subnetworks that are connected to components of the mTOR network. The immunopeptidome integrates events occurring at the transcriptional and co- or post-translational level.





**Figure AI.5 DEM source genes are regulated at multiple layers within specific mTOR subnetworks.** (A) The STITCH database (<http://stitch.embl.de/>) was used to generate a network from protein–protein interactions and functional associations involving identified DEM source genes, DEGs and mTOR network components. From the total network, subnetworks of DNA replication/transcription, cell cycle/proliferation, apoptosis, lipid biosynthesis, translation, proteasome and mTOR signaling were extracted. Legend for functional associations (edges) is depicted in Supplementary Figure AI.4. (B) EL4 cells were treated or not with rapamycin for 48 h. Total mRNA and NPR levels of the DEM source genes depicted in (A) were assessed by quantitative real-time PCR (see also Supplementary Table AI.6).

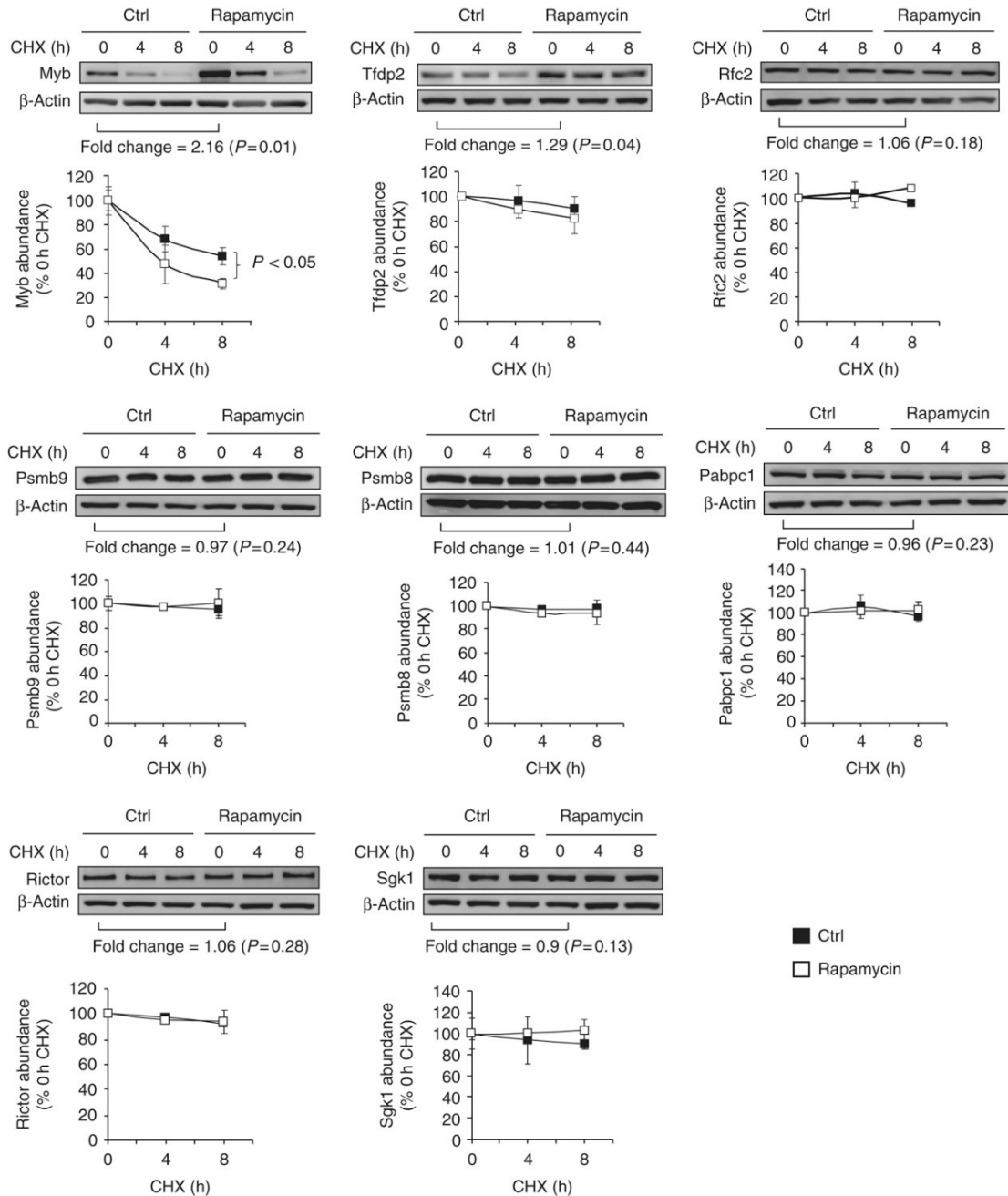


## **AI.7.5 The immunopeptidome integrates events occurring at the transcriptional and co- or post-translational level**

Generation of MIPs exploits generic cellular processes including transcription, translation and protein degradation (Yewdell et al, 2003; Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). However, the relative contribution of these different regulatory processes in moulding the immunopeptidome remains elusive. Here, we first sought to determine whether the 33 DEM source genes depicted in Figure AI.5A were translationally and/or transcriptionally regulated in response to rapamycin. After 48 h of rapamycin treatment, polysome-associated RNA as well as total RNA from both rapamycin-treated and -untreated cells were analyzed using quantitative real-time PCR. Translation of a large number of genes is reduced following rapamycin treatment (Grolleau et al, 2002). Accordingly, analysis of normalized polysomal mRNAs (NPR) (see Materials and methods) showed that, in rapamycin-treated cells, ribosomal loading efficiency was decreased for 36% (12/33), and increased for 6% (2/33) of the DEM source mRNAs (**Figure AI.5B**). In contrast, we observed that 36% (12/33) of the source genes were upregulated at the transcript level. Two points can be made from these data. First, while transcriptional activation could explain the increased abundance of about 36% of MIPs in rapamycin-treated cells, the role of translational activation appears negligible. As a corollary, increased levels of 20/33 MIPs can be ascribed to neither enhanced transcription nor translation of their source genes. From this, we infer that increased MIP levels on rapamycin-treated cells are caused mainly by co- and/or posttranslational mechanisms.

In order to probe the role of co- and/or post-translational mechanisms, we first assessed the abundance and stability of eight DEM source proteins by western blotting on total lysates from EL4 cells treated or not with rapamycin and cycloheximide (**Figure AI.6; Supplementary Table AI.6**). The abundance of two proteins was increased (Myb and Tfdp2) while that of the other six proteins was unchanged (Rfc2, Psmb9, Psmb8, Pabpc1, Rictor and Sgk1). Notably, the eight DEM source proteins were relatively stable with a half-life  $\geq 8$  h in the presence or absence of rapamycin. Myb was the only DEM source protein degraded more rapidly (two-fold; half-life from 8 to 4 h) in the presence of rapamycin. These data strongly suggest that MIP levels do not correlate with the abundance or stability of the native form of DEM source proteins.

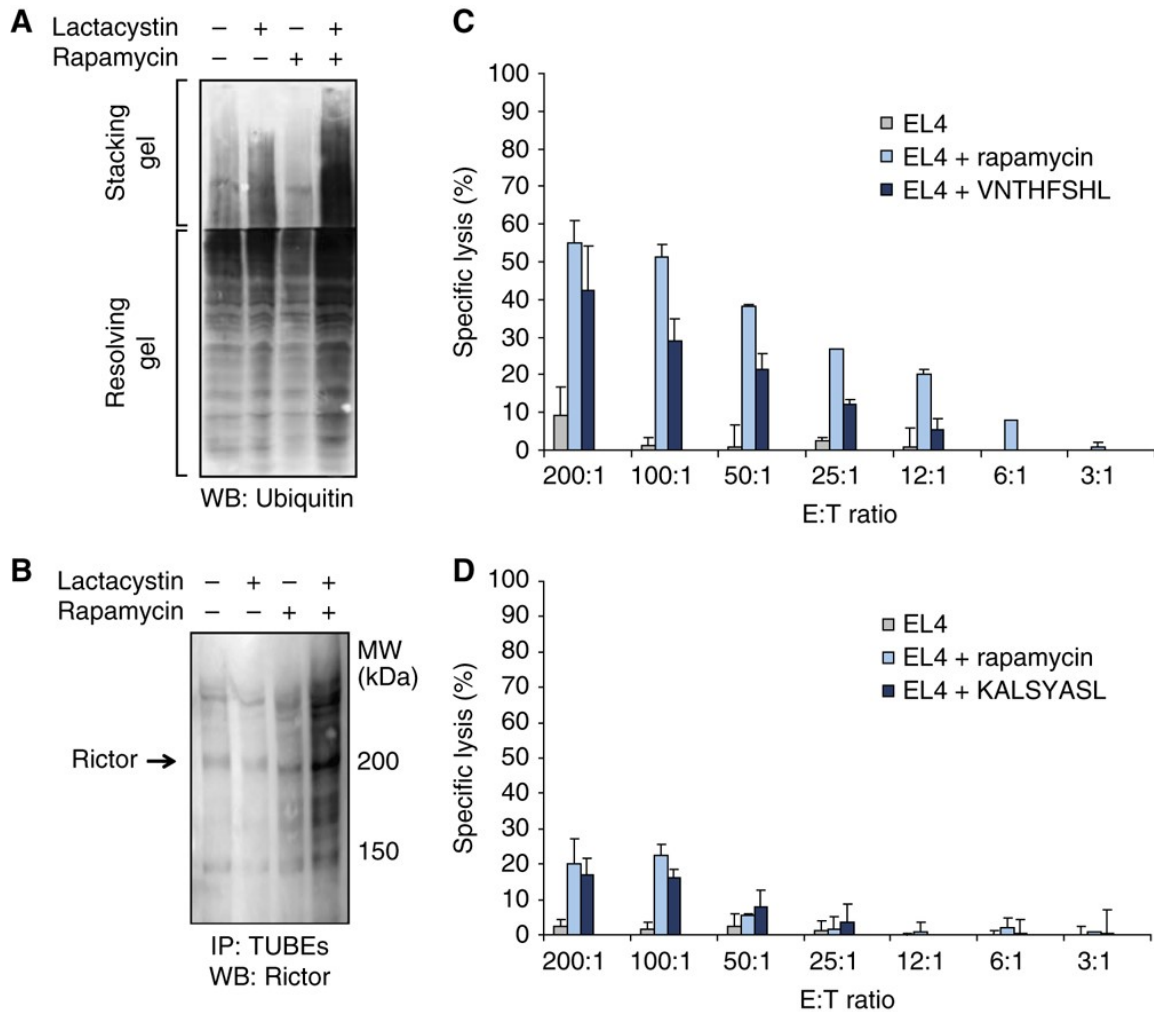
However, up to 30% of proteins are so rapidly degraded (with a mean  $t_{1/2}$  of ~10 min) by the ubiquitin-proteasome that they escape detection in standard cycloheximide chase experiments (Qian et al, 2006). Most of these rapidly degraded proteins are defective ribosomal products (DRiPs) resulting from imperfections of protein synthesis or assembly (Yewdell and Nicchitta, 2006). Accordingly, most protein species have two half-lives: a longer one for the well-conformed native protein and a short one for DRiPs. Importantly, MIPs are generated at higher efficiency from rapidly degraded proteins than from old proteins (Yewdell et al, 2003; Yewdell and Nicchitta, 2006). Western blotting experiments on whole EL4 cell extracts revealed that rapamycin increased the amount of proteasomal substrates, that is, ubiquitinated proteins that accumulate in lactacystin-treated cells (**Figure AI.7A**). We focused on Rictor, a DEM source protein that is a component of the mTOR complex 2, to evaluate more specifically whether rapamycin enhances proteasomal substrates generation from DEM source proteins. Rictor is coding for the KALSYASL peptide, which was exclusively detected after 48 h of rapamycin treatment (Supplementary Table AI.2). EL4 cells were treated or not with rapamycin for 48 h, with or without lactacystin for the last 8 h. In the presence of lactacystin, we observed a substantial accumulation of polyubiquitinated Rictor proteins in rapamycin-treated cells relative to untreated cells (**Figure AI.7B**). This result indicates that more polyubiquitinated Rictor proteins are subjected to proteasome-mediated degradation upon rapamycin treatment. Because steady-state levels of the native Rictor protein were not affected by rapamycin (**Figure AI.6**), we infer that the overabundant Rictor MIP derives from a rapidly degraded pool of Rictor and not from the long-lived native form of Rictor. Collectively, our data indicate that changes in the immunopeptidome integrate events occurring at the transcriptional and co- or post-translational level. Furthermore, consistent with the fact that mTOR links protein quality and quantity control (Qian et al, 2010), our work suggests that enhanced generation of rapidly degraded proteasomal substrates is instrumental to rapamycin-induced changes in the immunopeptidome. Altogether, our results show that the immunopeptidome projects at the cell surface a representation of biochemical networks and metabolic events regulated at multiple levels inside the cell.



**Figure AI.6 Relative abundance and stability of eight DEM source proteins in the presence or absence of rapamycin.** EL4 cells were treated or not (ctrl) with 20 ng/ml of rapamycin for 48 h. Levels of DEM source proteins were determined by western blotting and quantified by densitometry. Fold change indicates the rapamycin/ctrl protein abundance ratio. To estimate the half-life of DEM source proteins, cells were treated with cycloheximide (CHX) for 0, 4 and 8 h in the presence and absence of rapamycin. Results in the graphs are expressed as a percentage of the remaining protein abundance in CHX-treated cells relative to CHX-untreated cells.  $\beta$ -Actin served as a loading control. One representative western blot out of three is shown for individual proteins ( $P$ -value: Student's  $t$ -test). Source data is available for this figure in the Supplementary Information.

## **AI.7.6 MIPs appearing de novo on rapamycin-treated cells elicit cytotoxic T-cell responses**

Finally, we wished to determine whether MIPs that were exclusively detected on rapamycin-treated cells could be antigenic. To test this, we selected the KALSYASL and the VNTHFSSL peptide, which are encoded by Rictor and Ttc21b, respectively (Supplementary Table AI.2). We immunized C57BL/6 mice with dendritic cells (DCs) coated with KALSYASL or VNTHFSSL synthetic peptide. Splenocytes from immunized mice did not kill untreated EL4 cells, but they showed specific cytotoxicity for EL4 cells treated with rapamycin or EL4 cells coated with the peptide used for T-cell priming (**Figure AI.7C and D; Supplementary Figure AI.5**). Further studies are needed to evaluate 1) the proportion of novel or overabundant MIPs that are antigenic and (2) whether particular pathways and cellular processes generate MIPs that are more likely to be antigenic. Nevertheless, the antigenicity of KALSYASL and VNTHFSSL is consistent with the notion that the immune system is tolerant to MIPs expressed at physiological levels but can mount biologically relevant immune responses toward self MIPs present in excessive amounts (Schild et al, 1990).



**Figure AI.7 Rapamycin-treated cells contain increased levels of proteasomal substrates and express antigenic MIPs.** (A, B) EL4 cells were treated or not with 20 ng/ml rapamycin for 48 h, combined or not with 10 mM of lactacystin for the last 8 h. (A) Accumulation of ubiquitinated proteins was measured on total cell lysates by western blotting. (B) Polyubiquitinated proteins from total cell lysates were isolated with TUBEs and levels of polyubiquitinated Rictor were then determined by western blotting. One representative western blot out of three is shown. (C, D) Mice were immunized with DCs coated with VNTHFSHL (C) or KALSYASL (D) peptide. Splenocytes from primed mice were tested for cytotoxic activity against CFSE-labeled target EL4 cells at different E/T ratios. EL4 cells coated with VNTHFSHL or KALSYASL were used as positive control. Data represent the mean±s.d. for three mice per group. Source data is available for this figure in the Supplementary Information.

## AI.8 Discussion

Early proteomic studies were conducted with analyzers whose sensitivity (dynamic range) and accuracy were orders of magnitude inferior to that of MS analyzers that are now available (DePontieu et al, 2009; Yates et al, 2009; Nilsson et al, 2010). As a result, early studies on the immunopeptidome identified only the more abundant MIPs. Those MIPs were found to derive from highly abundant housekeeping proteins that are common to many cell types (Marrack et al, 1993; Hughes and Hughes, 1995; Barnea et al, 2002; Engelhard et al, 2002). More recently, high-throughput MS-based analyses have shown that the immunopeptidome conceals a cell-type specific signature. Thus, though the immunopeptidome of DCs and thymocytes partially overlap, no less than 40% of their MIPs are cell-type specific (Fortier et al, 2008; de Verteuil et al, 2010). The present study demonstrates that perturbation of a single signaling pathway can lead to significant changes in the composition of the immunopeptidome. More specifically, our work shows that dynamic changes of mTOR signals are reflected in MHC I presentation of numerous peptides associated with the mTOR interactome and its signaling network. An important question is whether changes in the MIP repertoire induced by rapamycin would be found in response to any type of cell stress. Two elements strongly support our contention that rapamycin-induced changes in the immunopeptidome are connected to the mTOR network. First, we found that the connectivity between DEM source genes and mTOR network components was amazingly strong ( $P < 10^{-5}$ ). A bootstrap procedure (500 000 iterations) failed to reveal a single set of peptide source genes that were so tightly connected to component of the mTOR network (**Figure AI.4C**). Second, we have previously evaluated the impact of other types of cell stress (tunicamycin, palmitate or glucose deprivation) on expression of MHC-peptide complexes at the surface EL4 cells (the cell line used the present study) (Granados et al, 2009). We found that cell stress induced by tunicamycin, palmitate and glucose deprivation led to a decrease in the generation of MIPs and in the expression of MHC I molecule. These effects are the exact opposite of what we found upon treatment of EL4 cells with rapamycin: overexpression of MHC I molecules (**Supplementary Figure AI.2B**) and increased abundance of cell surface MIPs (**Figure AI.2B**). In our opinion, it is therefore sound to conclude that rapamycin-induced variations in the immunopeptidome (1) arise from biochemical networks whose components are highly connected to the target of rapamycin (i.e. mTOR) and

(2) are not unspecific changes found with any type of cell stress. However, mTOR senses and integrates multiple environmental cues and mTOR network components interact with many signaling pathways, such as the Wnt pathway (Inoki et al, 2006; Caron et al, 2010). Therefore, further studies will be needed to determine whether perturbation of mTOR by other agents or in other contexts would bring the same changes in the MIP repertoire as those induced by rapamycin.

An important implication for the immune system is that, at the peptide level, the immune self is plastic and its molecular composition is influenced by the cell's metabolic activity. We found that variations in the immunopeptidome functionally reflected perturbations of rapamycin-sensitive metabolic processes regulated in the transcriptome. More precisely, we observed that changes in the MIP repertoire originate from genes that are very closely functionally connected to DEGs. We observed that only 2% of DEMs did originate directly from DEGs as measured by DNA microarray experiments. In contrast, quantitative PCR revealed that 36% of the DEM source genes were slightly upregulated at the transcript level. In fact, eight DEM source genes (Bptf, Bub1b, Ccnf, Chaf1b, Dtl, Mnat1, Myb and Tfdp2) in Figure AI.3 come from DEGs that were identified by quantitative PCR (fold change between 1.2 and 3.1; Supplementary Table AI.6) but missed by microarrays. Differences in the sensitivity of both techniques are likely to explain this discrepancy. Indeed, whereas microarrays permit genome-wide profiling of mRNA expression levels, traditional quantitative PCR is by far more sensitive (Germain et al, 2011). Therefore, genome-wide quantitative PCR would have revealed a more significant overlap between DEM source genes and DEGs. Although the overlap between DEM source genes and DEGs was underestimated from microarray data, altogether our data indicate that changes in MIP abundance originate mostly from post-transcriptional mechanisms. Furthermore, data integration analysis revealed that 82% of DEMs arised from subnetworks that were transcriptionally reorganized in response to rapamycin. Thus, modulation in the composition of the immunopeptidome might originate predominantly from gene-regulatory subnetworks that are transcriptionally perturbed in response to multiple cellular stresses (i.e. pathogen infection (Kumar et al, 2010)). In other words, genes involved in transcriptionally perturbed subnetworks, although not necessarily differentially expressed at the transcript level, might participate in modulating the composition of the immunopeptidome. Consequently,

identification of components within transcriptionally perturbed subnetworks might enable prediction of peptide source genes modulating the immunopeptidome's composition.

mTOR integrates environmental cues in terms of nutrients and growth factors. Therefore, it is reasonable to infer that cell-extrinsic factors modulate the repertoire of self peptides presented by MHC I. In addition, our results suggest that the peptide MHC I repertoire is a functional, if not a direct, representation of the transcriptional state of a cell. Together, that means the nature of the immune self is much more complex than anticipated. Moreover, the notion that MIPs presented specifically on metabolically stressed cells can be antigenic (e.g. KALSYASL and VNTHFSHL) could have several implications that need to be explored: immune responses against metabolic stress-associated MIPs could contribute to elimination of infected or transformed cells (Gleimer and Parham, 2003), but might also elicit autoimmunity (Todd et al, 2008). In keeping with this hypothesis, some self MIPs were found to be upregulated on infected cells, and some of them were immunogenic (Herberts et al, 2003; Hickman et al, 2003; Ovsyannikova et al, 2005).

From a more general perspective, our data provide a proof of concept that acquisition and integration of large-scale, quantitative biological data from multiple regulatory layers (i.e. -omics) may enable prediction of variations in the composition of the immunopeptidome. The notion that the immunopeptidome is plastic and conveys at the cell surface an integrative view of cellular protein metabolism opens up new perspectives in systems immunology and predictive biology (Benoist et al, 2006; Germain et al, 2011). The immune system has co-evolved with pathogens and positive selection imposed by pathogens has hastened the evolution of immune genes and thereby increased the complexity of the immune system (Waterston et al, 2002; Hedrick, 2004). Given the complexity of the immune system and the quintessential importance of self/non-self discrimination, it is imperative to further develop and exploit systems-level quantitative methods that will enable modeling of the immunopeptidome's plasticity. Such systems-oriented approaches will help to simulate and predict how cell-autonomous and -extrinsic elements modulate the composition of the immunopeptidome in health and disease.



## **AI.9 Acknowledgments and disclosure**

We thank Raphaëlle Lambert and Mathieu Courcelles (IRIC, Montreal, Canada) for technical support. We also thank Stephen W Michnick (Université de Montréal, Montreal, Canada) and Valeria de Azcoitia for comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (MOP 42384) and the Canadian Cancer Society (019475). EC and KV are supported by training grants from the Cole Foundation. M-HF was supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CP, PT and PPR are supported by the Canada Research Chairs Program. IRIC is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canada Foundation for Innovation, and the FRSQ.

Author contributions: EC designed the study, carried out the experiments, analyzed the data, prepared the figures and wrote the first draft of the manuscript. KV and M-PH carried out the experiments and prepared the figures. M-HF carried out the experiments and the MS analyses. J-PL, AB and GV carried out the bioinformatics analysis. CP and PT designed the study, analyzed the data, discussed the results and wrote the manuscript. SL and PPR contributed to the study design, discussed the results and commented on the manuscript.

## **AI.10 Supplementary methods**

### **AI.10.1 Label-free quantitative proteomics approach**

Label-free quantitative proteomics analyses were performed using ProteoProfile an in-house software that comprises three different modules. The peptide detection module generates an exportable .csv file that includes peptide features (m/z value, charge, retention time, intensity, score) subsequently used for clustering analyses. Intensity threshold was typically set to 10,000 counts for Orbitrap LC-MS experiments. Peptide identified by Mascot are then aligned with their corresponding peptide maps and their intensities across replicates and conditions are correlated by the clustering module using a complete linkage hierarchical clustering algorithm similar to that of Bellew et al (Bellew M., Coram M., Fitzgibbon M., Igra M., Randolph T., Wang P., MayD., Eng J., Fang R., Lin C., Chen J., Goodlett, D., Whiteaker J., Paulovich A., McIntosh M. (2006) A suite of algorithms for the comprehensive analysis of complex protein mixtures using high-resolution LC-MS *Bioinformatics* 22 1902-1909). Initially, m/z tolerance of  $\pm 0.035$  Th and a time difference of 1 min are used for clustering. Normalization of retention time is then performed on the initial peptide cluster list using a dynamic and nonlinear correction. A moving-average time-window interpolation scheme is used to compute the time shifts for each peptide across the different data sets. This alignment confines the retention time distribution to less than  $\pm 0.1$  min ( $< 0.3\%$  RSD) on average. Following normalization, peptides are then re-clustered using the complete linkage hierarchical clustering algorithm but with a tighter time tolerance (typically 30 seconds). This clustering analysis enables the comparison of abundance distribution for peptide ions sharing the same m/z, time, charge coordinates. We required confident peptide detection in at least two out of three replicate LC-MS analyses to consider a cluster for subsequent analysis. A simple heuristic function referred to as missing peaks was developed to retrieve missing peptide ions. After clustering, missing peaks will query the raw data for any replicates missing within a given cluster due to low intensity or false negative detection errors. The m/z and retention time of the average peptide clusters are used as a starting point in searching the raw data of the missing peptide. By using the time normalisation function, adjustment of target time is performed to efficiently locate the coordinates of missing peptide. Peak apex located within  $\pm 0.035$  Th and  $\pm 1$  min of the target peptide coordinates is

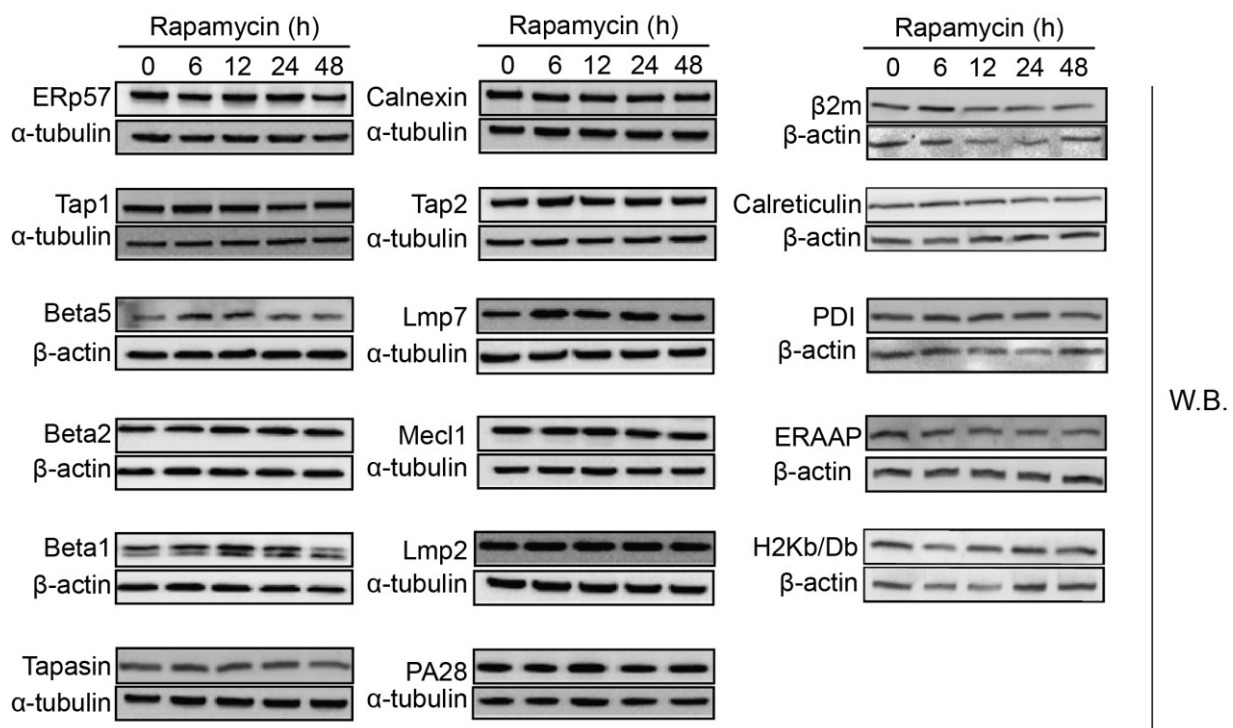
then considered. The RSD value of the retrieved peak must be within typically  $\pm 25\%$  of the average cluster intensity to be considered. In 2D LC-MS data, clustering is performed across salt fractions to combine the intensities of the same peptide found over adjacent fractions (typically  $\pm 2$ ). Differentially abundant peptides were selected on the basis of their statistical significance ( $p \leq 0.05$  using a paired t-test) and reproducibility of the control to challenge peptide-intensity ratio (at least 2-fold in 2 out of 3 replicate runs). The data generated by the clustering program and the peptide maps are available as Excel .csv file and can be included in downstream programs for further analysis. Peptide ions of interest were manually validated using the validation module that enables the verification of all ions assigned to a specific peptide cluster.

### **A1.10.2 PHP script for MHC class I peptide selection**

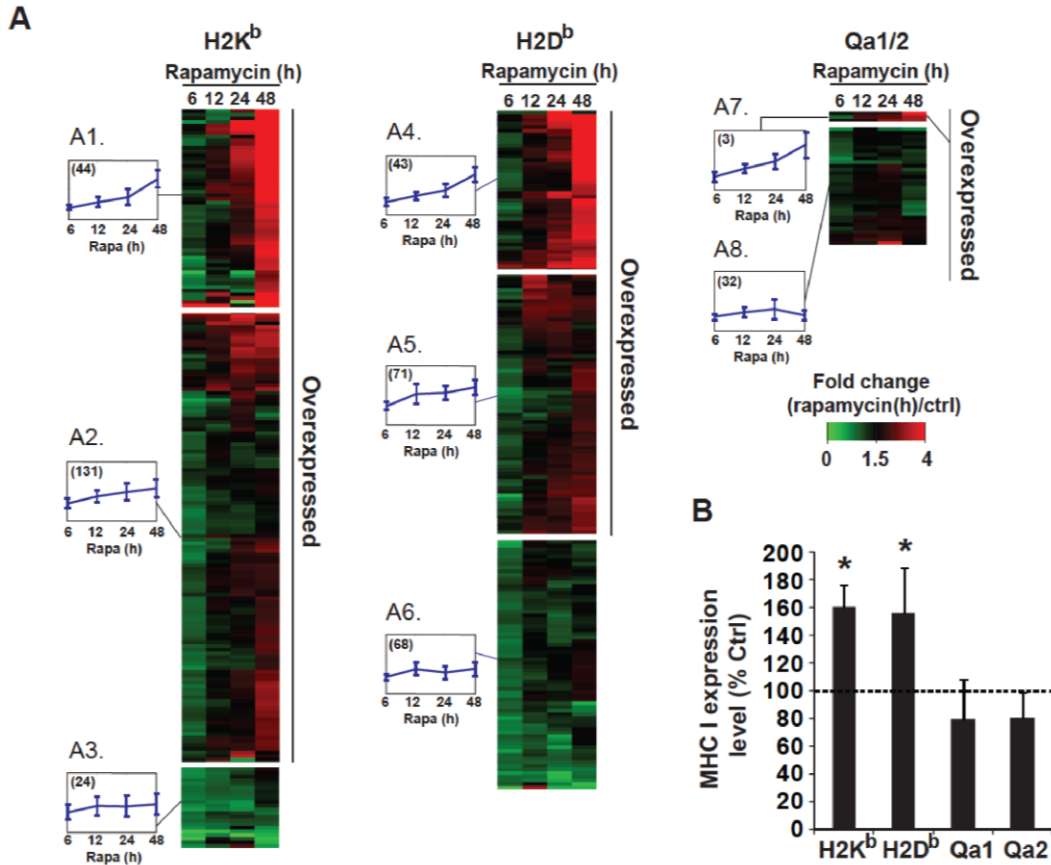
```
function isMHCpeptide($pepseq) {
    $peplength = strlen($pepseq);
    $poslast = substr($pepseq, $peplength -1, 1);
    if ($peplength >= 8 && $peplength <= 9) {
        $pos3 = substr($pepseq, 2, 1);
        $pos5 = substr($pepseq, 4, 1);
        $pos7 = substr($pepseq, 6, 1);
        if (preg_match('/[ILVMF]/', $poslast) && ((preg_match('/[YF]/', $pos3) && $peplength == 8)
        ||
        preg_match('/[YF]/', $pos5) ||
        (preg_match('/[H]/', $pos7) && $peplength == 9) || (preg_match('/[N]/', $pos5) && $peplength
        == 9))) {
            return 1;
        } else
        if ($peplength == 9 && preg_match('/LLL$/', $pepseq)) {
            return 1;
        }
        } else
        if ($peplength >= 10 && $peplength <= 13) {
```

```
$pos5 = substr($pepseq, 4, 1);  
if (preg_match('/[N]/', $pos5) && preg_match('/[ILVMF]/', $poslast)) {  
return 1;  
} }  
return 0;  
}
```

## AI.11 Supplementary figures



**Supplementary figure AI.1. Rapamycin does not affect levels of proteins involved in the antigen processing and presentation pathway** (Jensen *et al.*, 2007). Levels of the indicated proteins were determined by western blotting.  $\beta$ -actin and  $\alpha$ -tubulin served as loading controls. Data are representative of three independent experiments.



**Supplementary figure AI.2. Rapamycin increases the abundance of MIPs presented by MHC Ia molecules** (A) Representation of unsupervised hierarchical clustering of 416 MIPs detected and quantified at different time points. 6 MIPs were detected exclusively after 48h of rapamycin treatment and were not included in the clustering analysis. MIPs are represented vertically, and experimental conditions (i.e. rapamycin time course) are displayed horizontally. Clusters for H2K<sup>b</sup>-, H2D<sup>b</sup>-, and QAI/2-associated peptides are shown with the mean temporal profile in AI-A8. The number of MIPs per cluster is indicated in parenthesis. Clusters AI, 2, 4, 5 and 7 show MIPs that were progressively overexpressed upon rapamycin treatment. (B) Cell surface expression of MHC I allelic products was evaluated by flow cytometry after 48h of rapamycin treatment. Histogram shows the rapamycin/ctrl mean fluorescence intensity ratio for H2K<sup>b</sup>, H2D<sup>b</sup>, QAI and Qa2 (n=6, \**P* < 0.005, Student *t*-test).

**A**

Gene symbol	Cell cycle/proliferation	Proteasome	Protein complex assembly	Protein transport	DNA replication	Transcription
Ankrd26						■
Ap2a1			■	■		
Ap2a2			■	■		
Ash1l						■
BC066107						■
Bptf						■
Bub1b	■					
Ccnf	■					
Chaf1b					■	■
Copb1			■	■		
Dlg7	■					
Dtl					■	
ErbB2ip				■		
Foxj3						■
Hivep2						■
Mnat1						■
Mphosph1	■			■		
Myb						■
Plagl2						■
PsmA3		■				
PsmB8		■				
PsmB9		■				
PsmD2	■	■				
Ptpn11	■			■		
Rcc2	■					
Rfc2					■	
Sec24c				■		
Slc12a6	■					
Supt16h					■	■
Taf6						■
Tfdp2	■					■
Tmod1			■			
Vps33a				■		
Yif1a				■		
Zfp157						■
Zfp273						■
Zfp62						■
Znrd1						■

**Supplementary figure AI.3. Cellular processes enriched in the DEM source genes or the DEGs.**

(A) Representation of 38 genes encoding DEMs (rows) in 6 cellular processes (columns) that were enriched in the GO analysis. See also Supplementary Table AI.2.

**B**

Gene symbol	Unfolded protein response	ER-nucleus signaling	Signal transduction (small GTPase)	Phospholipid metabolic process	Reg. of kinase activity	Protein transport	Apoptosis
Agpat4							
Agpat9							
Akap13							
Ap3m2							
Arf2							
Arfgap3							
Arhgef10							
Arl4a							
Arl9							
Atf5							
Avpl1							
Bcl2l11							
Bmf							
Card6							
Casp4							
Cdkn1a							
Cebpg							
Cept1							
Derl2							
Dgka							
Dusp16							
Ero1l							
Evi5l							
Exoc4							
Fas							
Fcer1g							
Fgd6							
Gadd45a							
Gadd45g							
Gla							
Gng3							
Gsk3b							
H47							
lfng							
lhpk2							
lkbib							
lrak2							
ire1							
Jak2							
Kdelr3							
Kras							
Litaf							
Lyst							
Mcf2							
Mxra8							
Neb							
Nisch							
Nme5							
Nr4a1							
Optn							
Pcyt1b							
Pex26							
Pgap1							
Pign							
Pigv							
Pip5k1b							
Plekfh1							
Pmaip1							
Rab28							
Rab3d							
Rab6							
Rab13							
Rap2a							
Rarg							
Rasa4							
Rassf1							
Rerg							
Rhoc							
Rhou							
Rit1							
Rnf13							
Rad							
Ras							
Samd8							
Sec24d							
Sema6a							
Sft2d2							
Sipa112							
Slc25a14							
Slc25a36							
Smpd1							
Snap23							
Spred3							
Stk38l							
Stx11							
Stx1a							
Syt1							
Syt2							
Syt3							
Tigd2							
Tmem81							
Tnfrsf1b							
Traf2							
Trib3							
Tsc22d3							
Tubb6							
Ube2z							
Vps45							
Wdr19							
Wdr67							
Zfyve16							

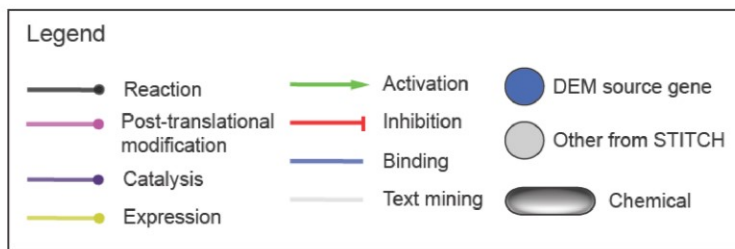
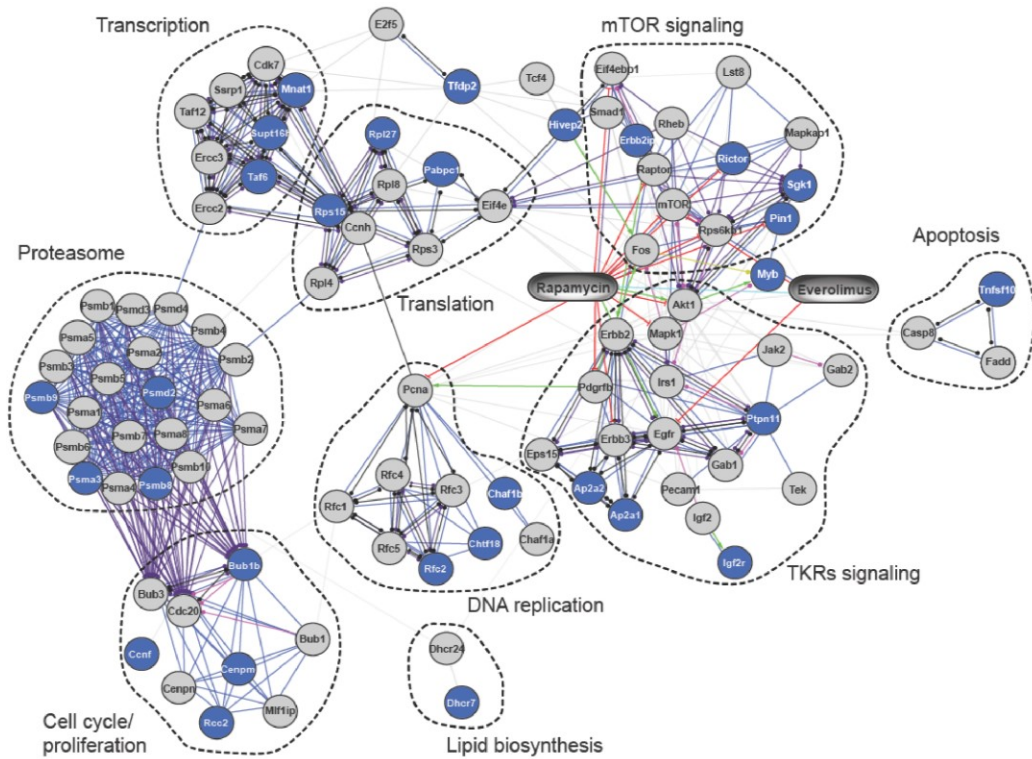
**Supplementary figure AI.3 continued. Cellular processes enriched in the DEM source genes or the DEGs. (B) Representation of 101 underexpressed genes (rows) in 7 cellular processes (columns) that were enriched in the GO analysis. See also Supplementary Table AI.2.**



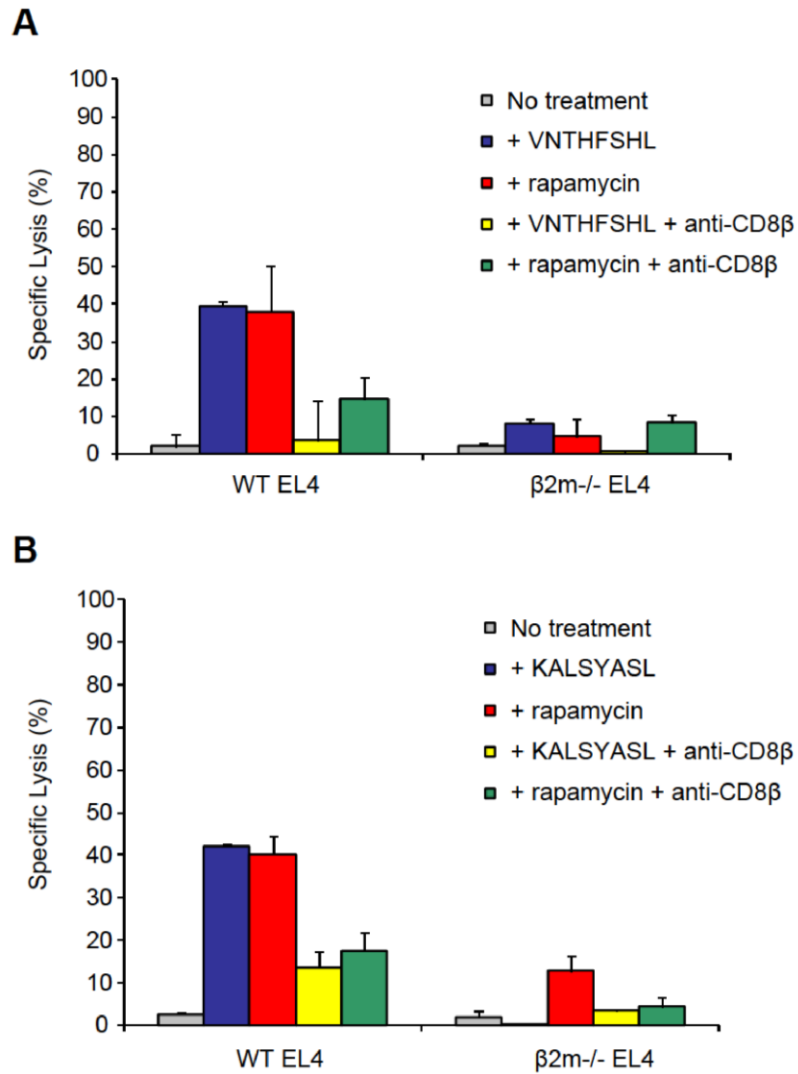
C

Gene symbol	Cell cycle/proliferation	Cell growth	Translation	Lipid biosynthesis	Nucleotide biosynthesis	rRNA processing	DNA replication	Transcription
Aacs								
Angptl4								
Aven								
Ayti2								
B4galt6								
Bop1								
Cspg5								
Dhcr24								
Dhcr7								
Dhodh								
Dlx1								
Dna2l								
E2f3								
Ebna1bp2								
Ecgf1								
Eef1e1								
Eftud2								
Eif3s9								
Eif4a2								
Etv5								
Exosc6								
Fabp5								
Fasn								
Hmgcr								
Hmgcs1								
Hnrpab								
Hsd17b7								
Kdi1								
Kcnma1								
Lama5								
Ldlr								
Lef1								
Mcm2								
Mcm6								
Mknk2								
Mrpl12								
Mvd								
Myc								
Nasp								
Nfix								
Nsdhl								
Oprs1								
Orc1l								
Pcyt2								
Phb								
Pole2								
Ppan								
Ppargc1b								
Rara								
Rasgrp2								
Rnu3ip2								
Rpl10a								
Rps13								
Rps15a								
Rpsa								
Rrp1b								
Ruvbl1								
Sfn								
Smarcc1								
Socs1								
Sod2								
Sox2								
Spn								
Thrap3								
Tnf								
Tnfrsf7								
Tytl								
Umps								
Utp14b								
Wdr46								

Supplementary figure AI.3 continued. Cellular processes enriched in the DEM source genes or the DEGs. (C) Representation of 70 overexpressed genes (rows) in 8 functional classes (columns) that were enriched in the GO analysis. See also Supplementary Table AI.2.



**Supplementary figure AI.4. DEM source genes are involved in cellular processes and signaling events governed by the mTOR network.** Source genes encoding Dems were analyzed with the STITCH database (<http://stitch.embl.de/>) and the network was elucidated based upon protein-protein interactions, protein-chemical associations, and functional associations. The emerging network elucidates a total of 30 DEM source genes distributed within different subnetworks, such as apoptosis, cell cycle/proliferation, DNA replication, lipid biosynthesis, proteasome, transcription, translation, mTOR signaling and tyrosine kinase receptors (TKRs) signaling. Rapamycin and everolimus (rapamycin analog) are the 2 unique chemicals that were revealed in the network. Symbols and arrows in the network are illustrated in the legend.



**Supplementary figure AI.5. Cytotoxic activity against VNTHFSL and KALSYASL is MHC-I restricted.** Specific lysis against wild-type and  $\beta$ 2-microglobulin deficient CFSE-labeled EL4 cells (Fortier et al, 2008) was estimated as in figure AI.7 at E:T ratio of 200:1 in the presence or absence of 5mg/ml of anti-CD8 $\beta$  antibody (clone H35-17.2). Data represent the mean  $\pm$  SD for three mice per group.

## AI.12 Supplementary tables

	GO term	GO number	Genes in sample	p value	Gene symbol	Cellular processes in Figure 3 and Supplementary Figure S3
Biological processes enriched in DEM source genes	Regulation of progression through cell cycle	GO:0000074	7	0.007	Bub1b, Ccnf, Ptpn11, Psmd2, Slc12a6, Tfdp2, Dlg7	Cell cycle/proliferation
	M phase of mitotic cell cycle	GO:0000087	5	0.012	Bub1b, Ccnf, Rcc2, Dlg7, Mphosph1	
	DNA replication	GO:0006260	4	0.044	Rfc2, Dtl, Chaf1b, Supt16h	DNA replication
	Transcription, DNA-dependent	GO:0006351	17	0.042	Hivep2, Mnat1, Myb, Taf6, Zfp62, Plagl2, Znrd1, Zfp157, Chaf1b, Supt16h, Ash1l, Bptf, Tfdp2, Zfp273, Foxj3, Ankrd26, BC066107	Transcription
	Regulation of transcription, DNA-dependent	GO:0006355	17	0.038	Hivep2, Mnat1, Myb, Taf6, Zfp62, Plagl2, Znrd1, Zfp157, Chaf1b, Supt16h, Ash1l, Bptf, Tfdp2, Zfp273, Foxj3, Ankrd26, BC066107	
	Protein complex assembly	GO:0006461	4	0.047	Ap2a1, Ap2a2, Tmod1, Copb1	Protein complex assembly
	Intracellular transport	GO:0046907	8	0.048	Ptpn11, Erbb2ip, Sec24c, Mphosph1, Ap2a1, Ap2a2, Yif1a, Copb1	Protein transport
	Protein transport	GO:0015031	8	0.043	Ptpn11, Erbb2ip, Sec24c, Vps33a, Ap2a1, Ap2a2, Yif1a, Copb1	
Proteasome complex	GO:000502	4	0.011	Pasma3, Pamb8, Pamb9, Psmd2	Proteasome	
Biological processes enriched in DEGs (overexpressed mRNAs)	Translation	GO:0006412	15	0.012	Lama5, Rpl10a, Eif3a9, Mknk2, Wdr46, Rpsa, Eif4a2, Rps15a, Mrpl12, Eftud2, Tnf, Eef1e1, Spn, Tnfrsf7, Rps13	Translation
	DNA replication	GO:0006260	8	0.010	Pole2, Mcm2, Mcm6, Dna2l, Nfix, Orc1l, Phb, Nasp	DNA replication
	Positive regulation of cellular metabolic process	GO:0031325	19	0.037	E2f3, Lef1, Ppargc1b, Smarcc1, Etv5, Hnrpab, Thrap3, Tnf, Tnfrsf7, Rara, Spn, Sox2, Myc, Dhcr24, Aven, Sod2, Tnfrsf7, Dlx1, Angptl4	Cell cycle/proliferation
	Steroid biosynthetic process	GO:0006694	9	0.00001	Dhcr7, Dhcr24, Hmgcr, Idl1, Oprs1, Hsd17b7, Mvd, Nsdhl, Hmgcs1	Lipid biosynthesis (sterol)
	Steroid metabolic process	GO:0008202	11	0.00006	Kcnma1, Ldlr, Dhcr7, Dhcr24, Hmgcr, Idl1, Oprs1, Hsd17b7, Mvd, Nsdhl, Hmgcs1	
	Cholesterol metabolic process	GO:0008203	9	0.00001	Dhcr7, Hmgcr, Hsd17b7, Ldlr, Nsdhl, Dhcr24, Mvd, Hmgcs1, Idl1	
	Lipid biosynthetic process	GO:0008610	15	0.00001	Dhcr7, Fasn, Hmgcr, Hsd17b7, Fabp5, Nsdhl, Oprs1, B4gal6, Pcyt2, Dhcr24, Aacs, Mvd, Hmgcs1, Aylt2, Idl1	
	Sterol metabolic process	GO:0016125	10	0.000001	Dhcr7, Hmgcr, Hsd17b7, Ldlr, Nsdhl, Oprs1, Dhcr24, Mvd, Hmgcs1, Idl1	
	Sterol biosynthetic process	GO:0016126	9	0.0000001	Dhcr7, Hmgcr, Hsd17b7, Nsdhl, Oprs1, Dhcr24, Mvd, Hmgcs1, Idl1	
	rRNA processing	GO:0006364	6	0.001	Rrp1b, Exosc6, Utp14b, Bop1, Rnu3ip2, Ebna1bp2	rRNA processing
	RNA processing	GO:0006396	17	0.0001	Sf3b3, Rrp1b, Ppilh, 6720458F09Rik, Syncrip, Hnrpab, Magoh, Bop1, Rnu3ip2, Ddx54, Pusl1, Lam7, Exosc6, Eftud2, Utp14b, Lam2, Ebna1bp2	Transcription
	Positive regulation of transcription, DNA-dependent	GO:0045893	9	0.043	E2f3, Hnrpab, Lef1, Rara, Smarcc1, Eftud2, Tnf, Ppargc1b, Thrap3	
	Positive regulation of transcription	GO:0045941	10	0.047	Etv5, E2f3, Hnrpab, Lef1, Rara, Smarcc1, Eftud2, Tnf, Ppargc1b, Thrap3	

Pyrimidine base metabolic process	GO:0006206	3	0.008	Dhodh, Ecgf1, Umps	Nucleotide biosynthesis
Pyrimidine nucleotide biosynthetic process	GO:0006221	4	0.003	Tyki, Dhodh, Ecgf1, Umps	
Nucleobase metabolic process	GO:0009112	3	0.026	Dhodh, Ecgf1, Umps	
Regulation of cell size	GO:0008361	6	0.044	Cspg5, Sfn, Ruvbl1, Socs1, Rasgrp2, Ppan	Cell growth
Regulation of cell growth	GO:0001558	6	0.015	Cspg5, Sfn, Ruvbl1, Socs1, Rasgrp2, Ppan	
rRNA metabolic process	GO:0016072	6	0.001	Ebna1bp2, Rrp1b, Exosc6, Utp14b, Bop1, Rnu3ip2	rRNA processing

Biological processes enriched in DEGs (underexpressed mRNAs)	Apoptosis	GO:0006915	29	0.038	1200009F10Rik, Atf5, Bcl2l11, Bmf, Card6, Casp4, Cdkn1a, Cebpg, Ern1, Fas, Fcer1g, Gadd45g, Gsk3b, Ifng, Itpk2, Irak2, Jak2, Kras, Litaf, Nme5, Nr4a1, Plekhf1, Pmaip1, Rarg, Sema6a, Traf2, Trib3, Tsc22d3, Ube2z	Apoptosis
	Cell death	GO:0008219	30	0.044	1200009F10Rik, Atf5, Bcl2l11, Bmf, Card6, Casp4, Cdkn1a, Cebpg, Ern1, Fas, Fcer1g, Gadd45g, Gsk3b, Ifng, Itpk2, Irak2, Jak2, Kras, Litaf, Nme5, Nr4a1, Plekhf1, Pmaip1, Rarg, Sema6a, Tnfrsf1b, Traf2,	
	Regulation of apoptosis	GO:0042981	22	0.025	Bcl2l11, Casp4, Cdkn1a, Cebpg, Fas, Fcer1g, Tsc22d3, Nr4a1, Kras, Rarg, Traf2, Gsk3b, Pmaip1, 1200009F10Rik, Plekhf1, Nme5, Itpk2, Ern1, Atf5, Irak2, Bmf, Card6	
	Positive regulation of programmed cell death	GO:0043068	12	0.040	Bcl2l11, 1200009F10Rik, Casp4, Cdkn1a, Cebpg, Ern1, Fas, Itpk2, Nr4a1, Plekhf1, Pmaip1, Rarg	
	Intracellular protein transport	GO:0006886	26	0.002	Ap3m2, Arf2, Arl4a, Jak2, Rab6, Snap23, Stx1a, Rnf13, Gsk3b, Arfgap3, Tigd2, Sec24d, Optn, Pex26, Tmem81, Stx11, Mxra8, Sytl2, Sytl3, Kdelr3, H47, Derl2, Wdr19, Zfyve16, Stk38l, Sytl1	Protein transport
	Protein transport	GO:0015031	37	0.004	Arf2, Arl4a, Jak2, Lyst, Rab3d, Rab6, Exoc4, Snap23, Stx1a, Vps45, Rnf13, Gsk3b, Ap3m2, Arfgap3, Tigd2, Sec24d, Optn, Pex26, Tmem81, Stx11, Mxra8, Sytl2, Sytl3, Kdelr3, H47, Derl2, Mcfd2, Wdr19, Zfyve16, Stk38l, Pgap1, Sytl1, Stf2d2, Rrad, Slc25a14, Slc25a36, Tubb6	
	Membrane lipid metabolic process	GO:0006643	11	0.036	A230097K15Rik, Agpat4, Cept1, Neb, Pcyt1b, Pign, Pigv, Pip5k1b, Samd8, Smpd1, Gla	Phospholipid metabolic process
	Phospholipid metabolic process	GO:0006644	10	0.020	A230097K15Rik, Agpat4, Cept1, Neb, Pcyt1b, Pign, Pigv, Pip5k1b, Samd8, Smpd1	
	ER-nuclear signaling pathway	GO:0006984	6	0.0005	Derl2, Ern1, Ero1l, H47, Ifng, Gsk3b	ER-nucleus signaling
	Small GTPase mediated signal transduction	GO:0007264	24	0.001	Akap13, Arf2, Arhgef10, Arl4a, Arl9, Evi5l, Fgd6, Kras, Niac, Rab28, Rab3d, Rab6, Rabl3, Rap2a, Rasa4, Rassf1, Rerg, Rhoc, Rhou, Rlt1, Rrad, Rras, Sipat12, Wdr67	Signal transduction (small GTPase)
	Unfolded protein response	GO:0030968	5	0.001	Derl2, Ern1, Ero1l, H47, Ifng	Unfolded protein response
	Regulation of kinase activity	GO:0043549	11	0.027	Gadd45g, Gng3, Gadd45a, Trib3, Cdkn1a, Irak2, Spred3, Ern1, Avpi1, Dgka, Dusp16	Regulation of kinase activity

**Supplementary table AI.3. GO terms enriched in DEM source genes and DEGs.** DAVID bioinformatics resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) were used to identify enriched biological processes ( $P < 0.05$ ) associated to DEGs and to genes coding for DEMs. Functionally related GO terms were annotated within unique cellular processes (last column). Biological processes enriched in DEM source genes are highlighted in blue. Biological processes enriched in over- and underexpressed mRNAs are highlighted in red and green, respectively.

Gene symbol	mRNA		Normalized polysomal mRNA		Protein		MIP	
	FC	p value	FC	p value	FC	p value	FC	p value
Ap2a2	0.77	0.09	0.78	0.17	n.d.	n.d.	3.39	0.007
Ap2a1	1.17	0.18	0.64	0.047	n.d.	n.d.	2.58	0.01
Bptf	1.42	0.06	1.12	0.12	n.d.	n.d.	4.70	0.004
Bub1b	1.66	0.02	0.64	0.002	n.d.	n.d.	3.62	0.05
Ccnf	3.07	0.01	0.92	0.04	n.d.	n.d.	6.05	0.02
Cenpm	1.15	0.16	1.25	0.21	n.d.	n.d.	3.90	0.01
Chaf1b	1.71	0.01	0.66	0.02	n.d.	n.d.	2.62	0.03
Chtf18	2.46	0.004	0.61	0.002	n.d.	n.d.	4.47	0.04
Dhcr7	3.74	0.01	0.75	0.07	n.d.	n.d.	3.81	0.009
Dtl	1.47	0.048	0.80	0.03	n.d.	n.d.	2.52	0.02
ErbB2ip	0.95	0.83	0.81	0.13	n.d.	n.d.	4.64	0.03
Hivep2	0.87	0.30	1.17	0.47	n.d.	n.d.	2.94	0.03
Igf2r	1.08	0.61	1.40	0.67	n.d.	n.d.	3.18	0.002
Mnat1	0.65	0.04	0.79	0.002	n.d.	n.d.	3.56	0.01
Myb	1.54	0.04	0.98	0.08	2.16	0.01	4.34	0.01
Nsmaf	0.98	0.88	1.05	0.81	n.d.	n.d.	3.47	0.004
Pabpc1	1.25	0.06	1.77	0.03	0.96	0.23	3.41	0.001
Pin1	0.92	0.08	1.21	0.23	n.d.	n.d.	3.02	0.02
Psm3	0.89	0.053	1.02	0.61	n.d.	n.d.	2.60	0.02
Psm8	1.05	0.34	0.96	0.54	1.01	0.44	5.39	0.02
Psm9	0.96	0.11	1.00	0.46	0.97	0.24	4.67	0.01
Psm2	0.98	0.92	0.54	0.001	n.d.	n.d.	3.46	0.02
Ptpn11	0.84	0.22	1.20	0.42	n.d.	n.d.	2.79	0.02
Rcc2	1.09	0.43	0.76	0.02	n.d.	n.d.	3.24	0.07
Rfc2	1.25	0.19	0.88	0.03	1.06	0.18	5.31	0.02
Rictor	1.26	0.02	1.15	0.17	1.06	0.28	9.73	0.003
Rpl27	0.91	0.47	1.10	0.53	n.d.	n.d.	4.63	0.001
Rps15	1.07	0.64	1.14	0.44	n.d.	n.d.	2.52	0.02
Sgk1	2.30	0.04	1.16	0.07	0.9	0.13	9.21	0.03
Supt16h	1.31	0.09	0.59	0.004	n.d.	n.d.	8.91	0.01
Taf6	1.08	0.42	0.77	0.04	n.d.	n.d.	4.07	0.003
Tfdp2	2.65	0.03	1.11	0.87	1.29	0.04	7.92	0.004
Tnfsf10	4.58	0.02	2.03	0.04	n.d.	n.d.	8.97	0.01

**Supplementary table AI.6. Relative expression of DEM source genes (blue) at multiple regulatory layers (see also Fig. AI.3b).** Fold change (FC) represents the rapamycin/ctrl abundance ratio. Overexpressed (red) and underexpressed (green):  $P < 0.05$ , no change (grey). n.d.: not determined. (n=3, Student *t*-test).



Gene symbol	Gene ID	Primer A	Primer B	Probe
Ap2a1	11772	CCTGGCTGTGTCTCGCTTA	TGTAGTCCTGGAGGTCAGTGG	Universal Library probe: #73
Ap2a2	11771	CTGTCTCGCTAGCTGTCTCG	CCTGAAGATCTGTTGATGCAGA	Universal Library probe: #15
Bptf	207165	CACCGTACGATGAGTCCAAA	CCGGTGGTACCAATTCTGAC	Universal Library probe: #76
Bub1b	12236	GTGTCCGGAGGTGCTCTGAA	TGGGGAAGTGCATTTAGGAA	Universal Library probe: #85
Ccnf	12449	GGCTTTCTGTTGGGGACAT	CCAGGTACTTGAGGTGGGAGT	Universal Library probe: #56
Cenpm	66570	TTGTGTTTGTGATTAACCTGCAC	AGCTGCTGTCCACGTGCT	Universal Library probe: #25
Chaf1b	110749	GCAGATCGCCTTTCAGGA	TTGCCAGCAAATATCATACA	Universal Library probe: #63
Chtf18	214901	CACCTGATGGGCAGTACCTC	CTTTCCGGGCAGGTAGTTCAG	Universal Library probe: #78
Dhcr7	13360	CCTTGTGGGTGCTTCC	CCACATAACCTGGCAGAAATC	Universal Library probe: #29
Dtl	76843	GCTGCCTACATTTGGAAGGT	AGAATGACCCAGGAGCACAG	Universal Library probe: #88
Erb2ip	59079	AAATGGTGCTTACTAATTACATGTTCC	GCAGGATTAATACTTTCATTATCTGA	Universal Library probe: #66
Hivep2	15273	ATTGATTTCAATTGGAACATTCTCTC	ATGATTTGCTCGACGCTTCC	Universal Library probe: #20
Igf2r	16004	TCAGTATGCAAAGTTCCTGTGG	TTGAATATTGGAGGGCCTGT	Universal Library probe: #53
Mnat1	17420	TGCAGCAGGCTCTGAAAAG	AGCAGAGCAACAGGGAGGT	Universal Library probe: #78
Myb*	17863	Mm00501741		
Nsmf	18201	CTTGCAATGGCTCTTCACTCT	TCTTTGTAGCATTTTGGATTCCT	Universal Library probe: #10
Pabpc1	18458	GGTGCCAGACCTCATCCA	TGTGAGGAAGCTGGTCTCATC	Universal Library probe: #68
Pin1**	23988	ACAGTTTCAAGTATTGCAGCTCTGCCA	AAAGATCACCAGGAGCAAGGAGGA	TGGTTTCTGCATCTGACCTCTGCT
Psma3	19167	GAAGCAGAGAAATATGCCAAGG	GCAACTGTTACAGAAATGTAAACCA	Universal Library probe: #60
Psmb8	16913	CACACTCGCCTTCAAGTCC	TCTCGATCACTTTGTTTCATCCTT	Universal Library probe: #81
Psmb9	16912	GCCCAAGCCATAGCTGAC	GATGTTCTTACCACGTTTGC	Universal Library probe: #78
Psmd2	21762	AATGGGAGATTCCAAGTCCA	TGACATCTCCATTGCAGGAC	Universal Library probe: #10
Ptpn11	19247	GAACATGACATCGCGGAGA	AACTGCCATCGACTCCTCTG	Universal Library probe: #18
Rcc2	108911	CTATCAGTTGGGGTCCATCG	AGAAGATGCCATCCAGAGTCTT	Universal Library probe: #79
Rfc2	19718	TTGAAGCTCAACGAAATAGTGG	GGGCACATTGCCTTCTCTT	Universal Library probe: #100
Rictor	78757	TTCCACTACAGACACAGTCCAGA	TGGTAGAAATCGTGCTTCTC	Universal Library probe: #41
Rpl27	19942	TGAAAGGTTAGCGGAAGTGC	TTTCATGAACTTGCCCATCTC	Universal Library probe: #40
Rps15	20054	TCGACCAACTGCTCGACAT	GCGCTTGAGCAGTGAGTGT	Universal Library probe: #82
Sgk1	20393	TGCCAGCAACACCTATGC	GAGGGGTTAGCGTTCATAAGC	Universal Library probe: #92
Supt16h	114741	TCATGAAGACCATTGTTGATGAC	CGTCCACAGCGTCACTCC	Universal Library probe: #83
Taf6	21343	GGATGTCTGCCTCAAAGCTC	CTCAGCCTTCTGTGCTCTT	Universal Library probe: #20
Tfdp2	211586	CGCAATGGTCACTCAGACTC	TCTCTAGCTCGTTTCTATCACTGG	Universal Library probe: #66
Tnfrsf10	22035	TGAGAACCTTTCAGGACACCA	GAGCTGCCACTTCTGAGGT	Universal Library probe: #52

\* Pre-designed Taqman gene expression assay from Applied Biosystems

\*\* Custom Taqman probe (Integrated DNA Technologies) specific assay

## Supplementary table AI.7. List of primers for quantitative real-time PCR analyses

Table AI.1, AI.S2, AI.S4 and AI.S5 can be found on web site at address:

<http://msb.embopress.org/content/7/1/533.long>

## AI.13 References

- Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, Larsen CP, Ahmed R (2009) mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460: 108–112
- Barnea E, Beer I, Patoka R, Ziv T, Kessler O, Tzehoval E, Eisenbach L, Zavazava N, Admon A (2002) Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens. *Eur J Immunol* 32: 213–222
- Baron C, Somogyi R, Greller LD, Rineau V, Wilkinson P, Cho CR, Cameron MJ, Kelvin DJ, Chagnon P, Roy DC, Busque L, Sékaly RP, Perreault C (2007) Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene expression profiling. *PLoS Med* 4: e23
- Benoist C, Germain RN, Mathis D (2006) A plaidoyer for ‘systems immunology’. *Immunol Rev* 210: 229–234
- Boehm T (2006) Quality control in self/nonself discrimination. *Cell* 125: 845–858
- Bonner PL, Lill JR, Hill S, Creaser CS, Rees RC (2002) Electrospray mass spectrometry for the identification of MHC class I-associated peptides expressed on cancer cells. *J Immunol Methods* 262: 5–19
- Caron E, Ghosh S, Matsuoka Y, Ashton-Beaucage D, Therrien M, Lemieux S, Perreault C, Roux PP, Kitano H (2010) A comprehensive map of the mTOR signaling pathway. *Mol Syst Biol* 6: 453
- Choo AY, Blenis J (2009) Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle* 8: 567–572
- Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J (2008) Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17414–17419
- Courcelles M, Lemieux S, Voisin L, Meloche S, Thibault P (2011) ProteoConnections: a bioinformatics platform to facilitate proteome and phosphoproteome analyses. *Proteomics* 11: 2654–2671
- de Verteuil D, Muratore-Schroeder TL, Granados DP, Fortier MH, Hardy MP, Bramoullé A, Caron E, Vincent K, Mader S, Lemieux S, Thibault P, Perreault C (2010) Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol Cell Proteomics* 9: 2034–2047
- Depontieu FR, Qian J, Zarling AL, McMiller TL, Salay TM, Norris A, English AM, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Topalian SL (2009) Identification of tumor-associated, MHC class II-



- restricted phosphopeptides as targets for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12073–12078
- Dilling MB, Germain GS, Dudkin L, Jayaraman AL, Zhang X, Harwood FC, Houghton PJ (2002) 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. *J Biol Chem* 277: 13907–13917
- Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N (2010) mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 328: 1172–1176
- Engelhard V, Brickner A, Zarling A (2002) Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire. *Mol Immunol* 39: 127
- Engelhard VH, Appella E, Benjamin DC, Bodnar WM, Cox AL, Chen Y, Henderson RA, Huczko EL, Michel H, Sakaguichi K (1993) Mass spectrometric analysis of peptides associated with the human class I MHC molecules HLA-A2.1 and HLA-B7 and identification of structural features that determine binding. *Chem Immunol* 57: 39–62
- Fortier MH, Caron E, Hardy MP, Voisin G, Lemieux S, Perreault C, Thibault P (2008) The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J Exp Med* 205: 595–610
- Germain RN, Meier-Schellersheim M, Nita-Lazar A, Fraser ID (2011) Systems biology in immunology: a computational modeling perspective. *Annu Rev Immunol* 29: 527–585
- Gleimer M, Parham P (2003) Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity* 19: 469–477
- Goldrath AW, Bevan MJ (1999) Selecting and maintaining a diverse Tcell repertoire. *Nature* 402: 255–262
- Granados DP, Tanguay PL, Hardy MP, Caron E, De Verteuil D, Meloche S, Perreault C (2009) ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol* 10: 10
- Grolleau A, Bowman J, Pradet-Balade B, Puravs E, Hanash S, Garcia-Sanz JA, Beretta L (2002) Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 277: 22175–22184
- Hammer GE, Kanaseki T, Shastri N (2007) The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity* 26: 397–406
- Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature* 402: C47–C52

- Hedrick SM (2004) The acquired immune system; a vantage from beneath. *Immunity* 21: 607–615
- Herberts CA, van Gaans-van den Brink J, van der Heeft E, van Wijk M, Hoekman J, Jaye A, Poelen MC, Boog CJ, Roholl PJ, Whittle H, de Jong AP, van Els CA (2003) Autoreactivity against induced or upregulated abundant self-peptides in HLA-A\*0201 following measles virus infection. *Hum Immunol* 64: 44–55
- Hickman HD, Luis AD, Bardet W, Buchli R, Battson CL, Shearer MH, Jackson KW, Kennedy RC, Hildebrand WH (2003) Cutting Edge: Class I presentation of host peptides following HIV infection. *J Immunol* 171: 22–26
- Hickman HD, Luis AD, Buchli R, Few SR, Sathiamurthy M, VanGundy RS, Giberson CF, Hildebrand WH (2004) Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J Immunol* 172: 2944–2952
- Hughes AL, Hughes MK (1995) Self peptides bound by HLA class I molecules are derived from highly conserved regions of a set of evolutionarily conserved proteins. *Immunogenetics* 41:257–262
- Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Appella E, Engelhard VH (1992) Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255: 1261–1263
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, Macdougald OA, You M, Williams BO, Guan KL (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126: 955–968
- Istrail S, Florea L, Halldorsson BV, Kohlbacher O, Schwartz RS, Yap VB, Yewdell JW, Hoffman SL (2004) Comparative immunopeptidomics of humans and their pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13268–13272
- Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B (2009) Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9: 833–844
- Kuhn M, Szklarczyk D, Franceschini A, Campillos M, von MC, Jensen LJ, Beyer A, Bork P (2010) STITCH 2: an interaction network database for small molecules and proteins. *Nucleic Acids Res* 38:D552–D556
- Kumar D, Nath L, Kamal MA, Varshney A, Jain A, Singh S, Rao KV (2010) Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 140: 731–743

- Marrack P, Ignatowicz L, Kappler JW, Boymel J, Freed JH (1993) Comparison of peptides bound to spleen and thymus class II. *J Exp Med* 178: 2173–2183
- Mester G, Hoffmann V, Stevanovic S (2011) Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cell Mol Life Sci* 68: 1521–1532
- Meunier MC, Delisle JS, Bergeron J, Rineau V, Baron C, Perreault C (2005) T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med* 11: 1222–1229
- Milner E, Barnea E, Beer I, Admon A (2006) The turnover kinetics of MHC peptides of human cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 5: 357–365
- Nilsson T, Mann M, Aebersold R, Yates III JR, Bairoch A, Bergeron JJ (2010) Mass spectrometry in high-throughput proteomics: ready for the big time. *Nat Methods* 7: 681–685
- Ovsyannikova IG, Johnson KL, Naylor S, Poland GA (2005) Identification of HLA-DRB1-bound self-peptides following measles virus infection. *J Immunol Methods* 297: 153–167
- Perreault C (2010) The origin and role of major histocompatibility complex class I-associated self peptides. *Prog Mol Biol Transl Sci* 92: 41–60
- Peters B, Sette A (2007) Integrating epitope data into the emerging web of biomedical knowledge resources. *Nat Rev Immunol* 7: 485–490
- Qian SB, Princiotta MF, Bennink JR, Yewdell JW (2006) Characterization of rapidly degraded polypeptides in mammalian cells reveals a novel layer of nascent protein quality control. *J Biol Chem* 281: 392–400
- Qian SB, Zhang X, Sun J, Bennink JR, Yewdell JW, Patterson C (2010) mTORC1 links protein quality and quantity control by sensing chaperone availability. *J Biol Chem* 285: 27385–27395
- Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X, Holland EC (2003) Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell* 12: 889–901
- Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O (1993) Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11: 213–244
- Rives AW, Galitski T (2003) Modular organization of cellular networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1128–1133
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22: 159–168

- Schild H, Rotzschke O, Kalbacher H, Rammensee HG (1990) Limit of T cell tolerance to self proteins by peptide presentation. *Science* 247: 1587–1589
- Schirle M, Keilholz W, Weber B, Gouttefangeas C, Dumrese T, Becker HD, Stevanovic S, Rammensee HG (2000) Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur J Immunol* 30: 2216–2225
- Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40: 310–322
- Sette A, Rappuoli R (2010) Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity* 33: 530–541
- Starck SR, Shastri N (2011) Non-conventional sources of peptides presented by MHC class I. *Cell Mol Life Sci* 68: 1471–1479
- Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Müller J, Bork P, Jensen LJ, von MC (2011)
- The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* 39: D561–D568
- Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 284: 8023–8032
- Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH (2008) The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8: 663–674
- Vizcaino JA, Côté R, Reisinger F, Barsnes H, Foster JM, Rameseder J, Hermjakob H, Martens L (2010) The Proteomics Identifications database: 2010 update. *Nucleic Acids Res* 38: D736–D742
- Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B (2010) The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res* 38: D854–D862
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P et al (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562
- Weinzierl AO, Lemmel C, Schoor O, Müller M, Krüger T, Wernet D, Hennenlotter J, Stenzl A, Klingel K, Rammensee HG, Stevanovic S (2007) Distorted relation between mRNA copy number and

corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol Cell Proteomics* 6: 102–113

Weinzierl AO, Maurer D, Altenberend F, Schneiderhan-Marra N, Klingel K, Schoor O, Wernet D, Joos T, Rammensee HG, Stevanovic S (2008) A cryptic vascular endothelial growth factor

T-cell epitope: identification and characterization by mass spectrometry and T-cell assays. *Cancer Res* 68: 2447–2454

Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 11: 49–79

Yewdell JW, Nichitta CV (2006) The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol* 27: 368–373

Yewdell JW, Reits E, Neefjes J (2003) Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nature Rev Immunol* 3: 952–961

Zarling AL, Polefrone JM, Evans AM, Mikesch LM, Shabanowitz J, Lewis ST, Engelhard VH, Hunt DF (2006) Identification of class I MHC-associated phosphopeptides as targets for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14889–1489