

Université de Montréal

Caractérisation des réponses contre des antigènes spécifiques aux tumeurs cryptiques pour le  
développement de thérapies contre les leucémies aiguës

*Par*

Caroline Rulleau

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en pharmacologie, option générale

Août 2020

© Caroline Rulleau, 2020

Université de Montréal

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Caractérisation des réponses contre des antigènes spécifiques aux tumeurs cryptiques pour  
le développement de thérapies contre les leucémies aiguës**

*Présenté par*  
**Caroline Rulleau**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Trang Hoang**  
Président-rapporteur

**Jean-Sébastien Delisle**  
Directeur de recherche

**John Stagg**  
Membre du jury

## Résumé

Le traitement des leucémies myéloïdes et lymphoblastiques aiguës a connu des avancées importantes dans la dernière décennie. Malgré ces progrès, le taux de rechutes reste élevé et le besoin médical est réel. Ces leucémies sont caractérisées par une expression aberrante d'antigènes qui peuvent provenir de protéines mutées, mais aussi de séquences rapportées comme non codantes. Les réponses contre ces néoantigènes tumoraux « cryptiques » demeurent non caractérisées. Afin de définir l'existence d'un répertoire varié de récepteurs des lymphocytes T (TCR) qui reconnaîtraient ces néoantigènes, des cellules mononuclées du sang périphérique de patients sains sont isolées puis enrichies en cellules T CD8<sup>+</sup> naïves. L'expansion et l'activation de ces cellules sont ensuite réalisées avec des cellules dendritiques autologues chargées avec l'antigène d'intérêt puis triées à l'aide de multimères HLA-peptides spécifiques. L'ARN des cellules avec TCR spécifiques aux antigènes spécifiques des tumeurs (TSA) leucémiques est isolé afin de réaliser un séquençage du TCR-bêta. L'expansion cellulaire a été réalisée de façon suffisante pour effectuer le séquençage des cellules identifiées comme positives par le marquage avec dextramères. Une réponse T est obtenue pour 50% des néoantigènes testés avec une réactivité montrée par ELISpot et se traduisant par une sécrétion de cytokines inflammatoires. Des lymphocytes T spécifiques aux TSA d'intérêt sont donc présents dans le sang périphérique de donneurs sains. Le séquençage de ces cellules a permis d'identifier les clonotypes pour lesquels une réponse anti-leucémique forte est possible. Il serait intéressant d'utiliser ces clonotypes spécifiques aux tumeurs cryptiques dans le développement de nouveaux traitements d'immunothérapie adoptive.

**Mots-clés** : tumeurs cryptiques, leucémies, néoantigènes, antigènes tumoraux spécifiques (TSA), immunothérapie cellulaire, complexe majeur d'histocompatibilité.

## Abstract

The treatment of acute myeloid and lymphoblastic leukemia has seen significant advances in the past decade. Despite this progress, the relapse rate remains high and the medical need is real. These leukemias are characterized by an aberrant expression of antigens, some from mutated proteins but also from sequences of DNA that were reported as non-coding. Responses against these “cryptic” neoantigens remains uncharacterized. In order to verify whether a diverse repertoire of T cell receptors (TCR) does recognize these neoantigens, mononuclear cells from peripheral blood of healthy patients are isolated and enriched with naive CD8<sup>+</sup> T cells. The expansion and activation of these cells are then carried out with autologous dendritic cells loaded with the antigen of interest and then sorted using HLA-peptide specific multimers. RNA from cells with TCR specific for leukemic tumor-specific antigens (TSA) is isolated in order to perform TCR-beta sequencing. Cell expansion was sufficient to perform the sequencing of cells identified as positive by staining with dextramers. A T-cell response is obtained for 50% of the neoantigens tested with reactivity shown by ELISpot and resulting in a secretion of inflammatory cytokines. T lymphocytes specific to the TSA of interest are therefore present in the peripheral blood of healthy donors. Sequencing of these cells made it possible to identify clonotypes for which a strong anti-leukemic response can be expected. It would be interesting to use these cryptic tumor-specific clonotypes in the development of new adoptive immunotherapy treatments.

**Keywords** : Cryptic tumors, leukemias, neoantigens, tumor-specific antigens (TSA), immunotherapy, major histocompatibility complex.

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract .....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures .....	10
Liste des sigles et abréviations.....	11
Remerciements.....	13
Introduction.....	15
1 Système immunitaire .....	16
1.1 Cellules présentatrices d'antigènes .....	16
1.2 Complexe majeur d'histocompatibilité.....	17
1.3 Lymphocytes T .....	18
1.3.1 Lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	18
1.3.2 Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	19
1.3.3 Différenciation des lymphocytes T.....	19
1.3.4 Fonctions effectrices des lymphocytes T.....	20
2 Développement des lymphocytes T .....	21
2.1 Développement des thymocytes .....	21

2.2	Sélection positive et négative.....	22
2.3	Récepteur des lymphocytes T .....	23
2.3.1	Réarrangement VDJ.....	23
2.3.2	Séquençage des TCR .....	23
2.3.3	Répertoire des lymphocytes T naïfs.....	24
3	Antigènes tumoraux .....	25
3.1	Immunothérapie adoptive et cancers du sang .....	25
3.1.1	Inhibiteurs de points de contrôle.....	25
3.2	Sources d'antigènes .....	26
3.3	Enjeux thérapeutiques.....	28
4	T-Cell Immunotherapies Targeting Histocompatibility and Tumor Antigens in Hematological Malignancies .....	31
5	Hypothèse et objectifs.....	74
5.1	Hypothèse .....	74
5.2	Objectifs.....	74
	Matériel et méthodes.....	75
6	Matériel et méthodes.....	76
6.1	Isolation des cellules mononuclées du sang périphérique ( <i>PBMCs</i> ) .....	76
6.2	Protocole d'expansion rapide (REP).....	76
6.3	Génération des cellules dendritiques (CD) .....	76

6.4	Génération des lignées de lymphocytes T .....	77
6.5	Analyses phénotypiques par cytométrie de flux .....	78
6.6	Test de réactivité IFN $\gamma$ enzyme-linked immunospot assay (ELISpot) .....	78
6.7	Marquage intracellulaire .....	78
6.8	Tri cellulaire .....	79
6.9	Séquençage .....	79
6.10	Analyses statistiques .....	79
7	Résultats .....	80
7.1	Identification des cellules dextramères positives à partir du sang périphérique de donneurs sains .....	81
7.2	Expansion des cellules dextramères positives par un protocole d'expansion rapide (REP) 82	
7.3	Identification des cellules dextramères positives après leur expansion .....	83
7.4	La méthode de co-culture requiert l'utilisation de cellules dendritiques matures .....	84
7.5	Des cellules T CD8 <sup>+</sup> peuvent être générées en grand nombre en co-culture .....	85
7.6	Des cellules de phénotype majoritairement CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> sont obtenues suite à la co-culture 86	
7.7	Des cellules au stade de différenciation Tcm et Tem sont principalement obtenues après trois semaines de culture .....	87
7.8	Des cellules T réactives à des TSA sont obtenues après co-culture .....	88
7.9	L'immunogénicité des aeTSA est confirmée par des tests fonctionnels .....	89

7.10 Le répertoire TCR $\beta$  des cellules T réactives aux aeTSA est oligoclonal et peu abondant

90

Discussion et conclusions .....	95
8 Discussion .....	96
8.1 Choix des cibles antigéniques .....	98
8.1.1 Origine des TSA .....	98
8.2 Limites de l'étude .....	99
8.3 Implantation clinique .....	100
8.3.1 Impact de la diversité des CMH sur le développement thérapeutique.....	100
8.3.2 Immunothérapie adoptive pour le traitement des patients cancéreux .....	101
8.3.2.1 Considérations du clonage TCR .....	102
8.3.3 Approche vaccinale.....	102
8.4 Conclusion et perspectives.....	103
Bibliographie.....	105
Annexes.....	113
9 Annexes.....	114
9.1 Annexe I.....	114
9.2 Annexe II .....	115



## Liste des tableaux

Tableau 1. –	Fréquence des cellules multimères positives utilisant la technique de REP.....	114
Tableau 2. –	Fréquence des cellules multimères positives utilisant la technique de co-culture..... .....	115

## Liste des figures

Figure 1. –	Représentation du développement $\alpha\beta$ des lymphocytes T .....	22
Figure 2. –	Cellules dextramères positives retrouvées dans le sang périphérique de donneurs sains. ....	82
Figure 3. –	Expansion des cellules dextramères positives. ....	82
Figure 4. –	Cellules dextramères positives après sélection et expansion cellulaire. ....	83
Figure 5. –	Caractérisation des CD requises pour la co-culture. ....	84
Figure 6. –	Expansion cellulaire en co-culture. ....	85
Figure 7. –	Caractérisation du phénotype des lignées cellulaires T. ....	86
Figure 8. –	Caractérisation de la différenciation des lignées cellulaires T. ....	87
Figure 9. –	Génération de lignées de cellules T TSA spécifiques en co-culture. ....	88
Figure 10. –	Évaluation de la fonctionnalité des lignées de cellules T TSA spécifiques en co-culture. ....	90
Figure 11. –	Taille et diversité clonales du répertoire TCR des cellules réactives au peptide SLTALVFHV ; $n = 1$ . ....	92
Figure 12. –	Proportion des clonotypes les plus abondants parmi les cellules réactives au peptide SLTALVFHV. ....	93
Figure 13. –	Nombre de clonotypes partagés selon la séquence de nucléotides des CDR3 des chaînes $\beta$ des TCR. ....	94

## Liste des sigles et abréviations

AA : Acides aminés

aeTSA : Antigène exprimé de façon aberrante spécifique des tumeurs

Ag : Antigène

AHCT : Transplantation de cellules hématopoïétiques allogéniques

ARN : Acide ribonucléique

CART : Cellule T avec récepteur antigénique chimérique

CD : cellules dendritiques

CDR3 : Région déterminant la complémentarité 3

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMHI : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMHII : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CRS : Syndrome de relâche de cytokines

CTL : Lymphocytes T cytotoxiques

DAMP : Motifs moléculaires associés aux dégâts

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DN : Double négatif

DP : Double positif

EBV : Virus d'Epstein-Barr

GVHD : Maladie du greffon contre l'hôte

GVT : Greffon contre la tumeur

HGSC : Cancers ovariens sévères de haut grade

HLA : Antigènes des leucocytes humains

ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire

ICI : Inhibiteurs de points de contrôle

IFN $\gamma$  : Interféron- $\gamma$

IL : Interleukine

LAMP1 : Protéine membranaire associée au lysosome

LFA : Antigène associé à la fonction lymphocytaire

LRSC : Chambre de leucoréduction  
MAP : Peptides associés au CMH  
MiHA : Antigènes mineurs d'histocompatibilité  
mTSA : Antigène muté spécifique des tumeurs  
NK : « Natural killer »  
ns-SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide non-synonyme  
NY-ESO-1 : Carcinome épidermoïde de l'œsophage de New York 1  
PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes  
PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique  
PKI : Inhibiteur de phosphate kinase  
PRAME : Ag exprimé de façon préférentielle dans le mélanome  
PRR : Récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires  
RAG : Gènes d'activation de la recombinaison  
REP : Protocole d'expansion rapide  
TAA : Antigène associé aux tumeurs  
TCR : Récepteur des lymphocytes T  
Tcm : Lymphocyte T central mémoire  
Teff : Lymphocyte T effecteur  
Tem : Lymphocyte T effecteur mémoire  
Th : Lymphocyte T auxiliaire  
TIL : Lymphocytes T infiltrant les tumeurs  
Tn : Lymphocyte T naïf  
TNF $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale  
Tm : Lymphocyte T mémoire  
TMB : Charge mutationnelle de la tumeur  
Treg : Lymphocyte T régulateur  
TSA : Antigène spécifique aux tumeurs  
S1PR : Récepteur au sphingosine-1-phosphate  
SP : Simple positif  
WT1 : Tumeur de Wilm 1

## Remerciements

Je voudrais remercier le Dr Jean-Sébastien Delisle, mon directeur de recherche, qui a su développer la passion de l'immunologie chez moi ainsi qu'une curiosité scientifique et un dépassement de soi. Je le remercie également pour sa vision et ses conseils. Je tiens aussi à remercier Dr Cédric Carli, pour sa présence, son soutien et ses précieux conseils. Je tiens à souligner toute l'équipe du laboratoire pour leur aide ainsi que l'environnement stimulant auquel ils ont tous contribué. Je remercie la faculté des études supérieures et postdoctorales pour leur soutien financier qui m'a permis de compléter ma maîtrise.

Je tiens également à remercier mes parents, Laurence et François. Je les remercie de leur soutien constant, de leurs encouragements et d'être un précieux modèle de persévérance. Un merci particulier à ma mère pour tout le temps qu'elle m'a accordé durant mes études, en plus de toute l'affection qu'elle a su m'apporter tout au long de mon parcours.



# **Introduction**

# 1 Système immunitaire

Le système immunitaire permet de lutter contre les agressions par des agents pathogènes (1). C'est l'action de deux systèmes interconnectés, l'immunité innée et adaptative, qui assure la défense de l'organisme (2). L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme et intègre aussi bien des barrières anatomiques que cellulaires (3). Les réponses immunitaires innées sont non spécifiques et surviennent rapidement après une infection (3). C'est grâce à des récepteurs de surface ou intracellulaires que sont initiées ces réponses (3). Les cellules dendritiques (CD), les cellules « natural killer » (NK), les macrophages, les monocytes et les neutrophiles sont des acteurs importants de la réponse immunitaire innée (1). Ces cellules sont activées suite à la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou de motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP) par les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR) (4). Cette étape amène l'élimination des cellules infectées par divers mécanismes telles la phagocytose, l'opsonisation, l'activation du système du complément et la sécrétion de cytokines (1). L'immunité innée permet aussi l'activation du système adaptatif afin d'établir une réponse spécifique (2). Le système adaptatif fait intervenir les lymphocytes B et T comme acteurs principaux (2). La réponse par les lymphocytes B amène une immunité humorale qui sera caractérisée par la production d'anticorps tandis que celle conférée par les lymphocytes T amène une immunité cellulaire (1). Le système immunitaire est un système d'une grande complexité pour répondre à différentes sources d'agressions. L'introduction présentée dans ce mémoire décrit seulement une partie du système immunitaire et de ses mécanismes, nécessaires à la compréhension des travaux.

## 1.1 Cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ont pour rôle de faire le lien entre les systèmes inné et adaptatif en activant ce dernier (5). Les CD sont les principales CPA, mais les monocytes et les macrophages remplissent également ces fonctions (5, 6). Les CD immatures se situent dans les tissus épithéliaux où elles peuvent lier divers pathogènes grâce aux PRR (5). Elles quittent alors le site d'infection afin de présenter l'antigène (Ag) apprêté, c'est-à-dire internalisé puis dégradé en peptides, aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires (7). Les peptides sont



présentés par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) situées sur les CD qui deviennent matures en augmentant leur niveau de molécules du CMH et de molécules de co-stimulation, telles CD80, CD83 et CD86, pour une activation efficace des lymphocytes T (6). Ce mécanisme rend les CD, dites CPA professionnelles, particulièrement intéressantes dans le contexte d'activation des lymphocytes T naïfs (Tn).

## 1.2 Complexe majeur d'histocompatibilité

Le CMH, qui est polygénique et polymorphe, permet la présentation par les CPA des fragments d'Ag aux lymphocytes T (8). Il existe deux principales classes de molécules du CMH ayant une structure et fonction similaires, soit le CMH de classe I (CMHI) et le CMH de classe II (CMHII). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires qui forment des complexes stables avec les Ag qu'elles présentent (9).

Presque toutes les cellules nucléées ont des CMHI et présentent principalement des Ag provenant du cytosol, soit des peptides endogènes. Ces peptides peuvent être d'une grandeur de 8 à 10 acides aminés (aa) et sont présentés aux lymphocytes T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) (9). Les molécules du CMHI sont constituées d'une chaîne variable alpha ( $\alpha$ ) se liant à la chaîne commune bêta ( $\beta$ )2-microglobuline (9). À l'inverse, seules les CPA expriment des molécules du CMHII qui reconnaissent des peptides exogènes, généralement de 13 à 25 aa, et activent alors les lymphocytes T auxiliaires (CD4<sup>+</sup>) (10). Les molécules du CMHII sont pour leur part constituées de deux chaînes, soit une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  (10).

Il existe plusieurs centaines de variants alléliques des molécules des CMHI et CMHII qui diffèrent, mais au maximum 6 molécules différentes de classe I et 6 molécules différentes de classe II sont exprimées par un individu (1). Une molécule du CMH peut toutefois lier différents peptides permettant de présenter une variété d'Ag aux cellules T.

Les molécules du CMH sont appelées les Ag des leucocytes humains (HLA) chez l'homme. Cet ensemble de gènes très polymorphes est situé sur le chromosome 6 et chaque individu a ses propres composantes du HLA (11). La chaîne  $\alpha$  du CMHI est codée par les gènes A, B et C, dits gènes

classiques, mais les gènes supplémentaires E, F et G codent également pour des gènes du CMHI (10). Les deux chaînes du CMHII sont quant à elle codées par les gènes DP, DQ et DR et d'autres gènes non classiques existent aussi pour ce CMH, tels les gènes DM et DO (10).

### **1.3 Lymphocytes T**

Les cellules principales de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes T, dont les fonctions effectrices permettent l'élimination de cellules infectées ou de cellules cancéreuses, faisant d'elles des cellules attrayantes pour une utilisation en thérapie cellulaire. Ces cellules sont caractérisés par l'expression du récepteur CD3 à leurs surfaces. L'activation des lymphocytes T se produit sous l'effet de trois signaux, dont le premier arrive lorsqu'il y a reconnaissance spécifique, par le lymphocyte T à l'aide de son TCR, d'un Ag présenté en association avec une molécule du CMH présente à la surface d'une CPA. (12). La stabilisation de la liaison du complexe TCR-CMH-Ag se fait grâce aux co-récepteurs CD4 et CD8 des lymphocytes T en augmentant son affinité. Un autre élément permet une meilleure transduction du signal par la présence de molécules d'adhésion (ex. l'Ag 1 associé à la fonction lymphocytaire (LFA-1) et la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1)), qui augmentent la durée d'interaction entre le lymphocyte T et la CPA (12, 13). Le second signal permet la survie et la prolifération des lymphocytes T et se fait grâce à la liaison de molécules de co-stimulation (ex. CD28, CD80/86) présentes sur les CPA (12, 13). Enfin, le troisième signal est médié par les cytokines qui augmentent l'activation des lymphocytes T, mais qui permettent également la différenciation de ceux-ci. Lorsqu'il y a liaison du TCR des lymphocytes Tn, CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>, avec un complexe CMH-Ag situé sur une CPA, la cellule T s'active, prolifère et se différencie en cellule effectrice (12).

#### **1.3.1 Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Une fois activés, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en l'un des principaux sous-types effecteurs suivants : lymphocytes T auxiliaires (Th) 1, Th2, Th17 et lymphocytes T régulateurs (Treg). Chacune des sous-populations est responsable de l'élimination d'un type de pathogènes différent. En effet, les Th1 éliminent les pathogènes à multiplication intracellulaire, les Th2 éliminent les pathogènes à multiplication extracellulaire, tels les helminthes, alors que les Th17

sont spécialisés dans l'élimination des bactéries à multiplication extracellulaire et les champignons (14). Finalement, les Treg sont pour leur part capables d'inhiber la réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, grâce à leur sécrétion de cytokines, contribuent à l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (13).

### **1.3.2 Lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés se différencieront en cellules effectrices appelées lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les cellules tumorales, les cellules infectées par des virus et les cellules de greffe de tissu étranger sont éliminées grâce aux CTL.

### **1.3.3 Différenciation des lymphocytes T**

La différenciation de la cellule T en lymphocytes T effecteurs (Teff), pouvant migrer au site d'inflammation ou en lymphocytes T mémoires (Tm), capables de produire une réponse encore plus efficace lors d'un second stimulus, est dictée par la force du signal d'activation (15, 16). Il s'agit d'un phénomène plus complexe, mais une description brève pour les besoins de ce mémoire permet de dire que principalement trois stades de différenciation existent, allant de lymphocytes Tn, à Tm, à Teff. L'expression de la molécule d'adhésion CD62L et du récepteur de chimiokine CCR7, qui permettent aux cellules en circulation d'entrer dans les organes lymphoïdes secondaires, est observée sur les Tn non différenciés (17, 18). Par contre, une fois en contact avec son Ag, le niveau d'expression de ces deux récepteurs diminue et permet alors aux lymphocytes T de rester dans les tissus inflammés (19). Une fois activés, les lymphocytes T mémoires ou effecteurs, acquièrent l'expression de la phosphatase CD45RO. Il existe trois sous-types de Tm, soit « Stem cell like » mémoire (Tscm), central mémoire (Tcm) ou effecteur mémoire (Tem), classé selon leur localisation, leurs fonctions effectrices et l'expression de marqueurs de surface (17). Les Tcm ont une faible capacité effectrice immédiate, mais persistent à long terme, assurant une protection de longue durée advenant une réinfection par le même pathogène (20). Ils expriment à leur surface le CD62L, le CCR7 et le CD45RO et sont principalement retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (17). Les Tem perdent quant à eux l'expression du CD62L et du CCR7, tout en conservant l'expression du CD45RO. Ceci leur permet de rester dans les tissus non lymphoïdes inflammés pour éliminer les pathogènes puisqu'ils ont des fonctions effectrices immédiates (17).

Finalement, les Teff ont une durée de vie plus courte, mais possèdent un maximum de fonctions effectrices immédiates (production de cytokines, dégranulation et activation des macrophages) (20).

### **1.3.4 Fonctions effectrices des lymphocytes T**

La capacité de la cellule T à produire différentes cytokines inflammatoires fait partie intégrante de ses fonctions effectrices. Parmi ces cytokines, l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) est un facteur qui entraîne la résistance des cellules à l'infection virale alors que l'interleukine (IL)-2 induit quant à elle la prolifération et la différenciation lymphocytaire (21). Pour sa part, le facteur de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ) participe également à la différenciation et prolifération cellulaire ainsi qu'à l'induction de la mort cellulaire (21). Contrairement aux Tn, les Tm pourront sécréter rapidement des cytokines lors d'une restimulation (22). De plus, les Tm sont capables de produire du TNF $\alpha$ , et les Tem pourront produire davantage d'IL-2 alors que les Tem produisent plus d'IFN $\gamma$  (23). L'activité cytotoxique est une autre fonction effectrice principale des lymphocytes T et se traduit par une lyse des cellules cibles. Cette lyse se fait surtout par l'intermédiaire de deux molécules contenues dans les granules cytolytiques, soit la perforine et le granzyme B, et résulte en l'apoptose de la cellule cible (21). Une autre fonction effectrice associée aux lymphocytes T est la dégranulation, évaluée par l'expression du CD107a (24). La membrane des granules contenant les médiateurs cytotoxiques perforine et granzyme B contient le CD107a ou protéine membranaire associée au lysosome (LAMP1). Cette dernière est donc exprimée normalement sur les vésicules intracellulaires, mais est également présente de façon transitoire du côté extracellulaire de la membrane, suite à l'exocytose de ces vésicules et indique par conséquent que la dégranulation a eu lieu (25).

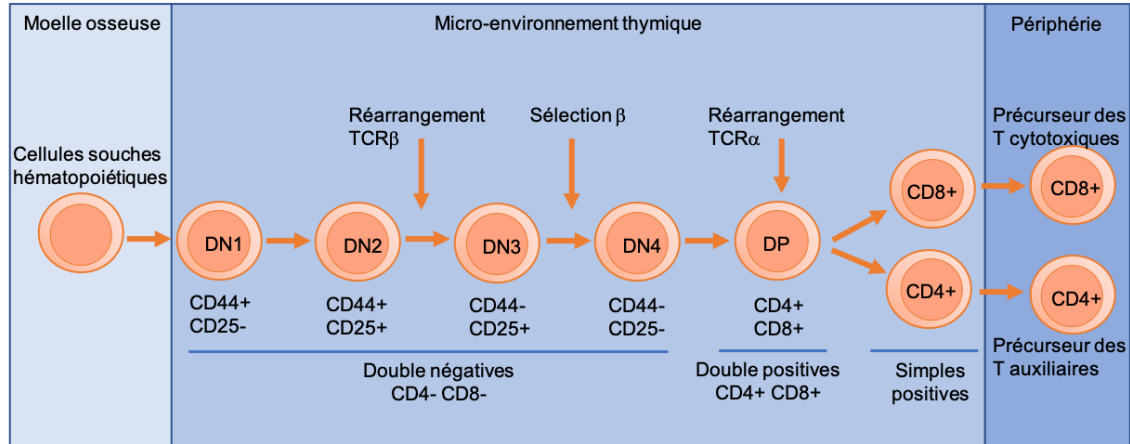
## 2 Développement des lymphocytes T

Des millions de lymphocytes T circulent dans l'organisme, exprimant chacun un TCR unique. Lorsque les cellules matures quittent le thymus, elles expriment une variété de récepteurs de spécificités différentes et sont à la fois tolérantes et restreintes au Soi.

### 2.1 Développement des thymocytes

Les cellules T dérivent de cellules souches hématopoïétiques qui voyagent par le sang depuis la moelle osseuse pour migrer vers le thymus à la jonction cortico-médullaire (26). Ces précurseurs peuvent toutefois encore donner naissance à différents types cellulaires, tels les cellules NK, les lymphocytes B, les CD et même des cellules de la lignée myéloïde (27, 28). C'est la présence du récepteur Notch qui est responsable de l'engagement des précurseurs vers la lignée T (27). Ces cellules T immatures sont appelées thymocytes et passent par différents stades de maturation qui durent d'une à trois semaines avant de devenir des lymphocytes T fonctionnels (Figure 1). En effet, les cellules précoces n'expriment ni le CD4, ni le CD8 et sont nommées doubles négatives (DN) (29). Il existe quatre sous-groupes (DN1-4) de cellules DN caractérisées par l'expression des molécules de surface CD44, une molécule d'adhésion, et la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2, le CD25 (29). Les DN1 sont CD44<sup>+</sup> et CD25<sup>-</sup> et ne sont pas encore engagés vers la lignée T. Une fois qu'ils ont acquis l'expression du CD25, ils deviennent DN2 (CD44<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>) et procèdent au réarrangement des gènes des chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$  grâce aux protéines RAG1 et RAG2 (29). Les cellules engagées vers la lignée T au stade DN3 (CD44<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup>) rejoignent en majorité la lignée des TCR $\alpha\beta$ , mais une petite proportion, environ 5%, peuvent devenir des lymphocytes TCR $\gamma\delta$  (30). Les cellules DN3 qui réarrangent correctement leur chaîne  $\beta$  procèdent à la sélection- $\beta$  (31). La chaîne  $\beta$  se paire avec la chaîne pré-T $\alpha$ , une glycoprotéine invariante de 33 kDa afin de former, en liaison avec des molécules CD3, le pré-TCR (1). Les cellules qui ne réussissent pas la sélection- $\beta$  meurent par apoptose. La sélection- $\beta$  résulte en la diminution d'expression du CD25, menant au stade DN4 (CD44<sup>-</sup>, CD25<sup>-</sup>) (32). Les cellules DN4 passent ensuite directement au stade double positif (DP) CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> suite à une prolifération rapide des cellules. Cette prolifération permet d'augmenter la diversité des récepteurs. Lorsque les thymocytes arrêtent de proliférer, le

réarrangement de la chaîne  $\alpha$  du TCR peut avoir lieu et ainsi remplacer la chaîne pré-T $\alpha$  afin de former le TCR $\alpha\beta$  (32).



**Figure 1. – Représentation du développement  $\alpha\beta$  des lymphocytes T**

## 2.2 Sélection positive et négative

Les thymocytes DP, qui résident au niveau du cortex thymique, sont les premiers thymocytes à exprimer un complexe TCR $\alpha\beta$ /CD3 et procèdent ensuite à la sélection thymique (31). Cette dernière comporte 2 étapes ; la sélection positive et la sélection négative, dont l'objectif final est d'obtenir des cellules matures capables de reconnaître des Ag étrangers présentés par des molécules de CMH du Soi (29). La sélection positive, qui s'effectue dans le cortex, permet donc de sélectionner les thymocytes dont les récepteurs se lient aux molécules du CMH du Soi alors que la sélection négative, qui s'effectue dans le cortex puis dans la médulla, permet d'exclure les thymocytes dont les récepteurs ont une forte affinité pour les complexes CMH du Soi/peptides du Soi (33). Dans le thymus, seuls des peptides du Soi, qui dérivent des protéines intracellulaires et extracellulaires dégradées par le métabolisme cellulaire, peuvent être présentés. Les thymocytes sont en contact avec les cellules épithéliales thymiques exprimant à leur surface les CMHI et CMHII en forte quantité qui présentent ces peptides du Soi. Une majorité de thymocytes (98%) meurent par apoptose lors de ce procédé, principalement lors de la sélection positive (95%) (1). Suite à la sélection thymique, la cellule va diminuer l'expression du CD4 ou du CD8 afin d'obtenir des cellules simples positives (SP). Les cellules SP quittent le thymus grâce au récepteur au

sphingosine-1-phosphate (S1PR) à la jonction cortico-médullaire afin de parcourir la périphérie (26).

## **2.3 Récepteur des lymphocytes T**

La capacité des lymphocytes T à reconnaître et à répondre à une variété d'Ag étrangers leur est conférée grâce à leur TCR (34). Cette structure hautement polymorphique est composée de deux chaînes protéiques ( $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ ), chaque chaîne étant composée d'une région constante et d'une région variable. Le complexe de signalisation des lymphocytes T inclut également un complexe de protéines appelé CD3, étant constitué de trois dimères (35).

### **2.3.1 Réarrangement VDJ**

Les gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  (TCRA) et  $\beta$  (TCRB) du TCR sont situés chez l'Homme sur les chromosomes 14 et 7 respectivement (36). Ces gènes sont composés de segments non contigus comprenant les segments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) pour TCRB et des segments V et J pour TCRA (37). De façon similaire aux gènes d'immunoglobulines, les gènes de TCR sont assemblés par la recombinaison des segments V(D)J qui est catalysée par le complexe enzymatique de gènes d'activation de la recombinaison (RAG)1/2, spécifique aux lymphocytes (37). La diversité des TCR provient de la combinaison aléatoire de segments de gènes (diversité combinatoire) et par l'addition et la suppression aléatoire des segments joints au site de jonction (diversité jonctionnelle) (38). La section appelée région déterminant la complémentarité 3 (CDR3) est celle codée par la jonction V(D)J et constitue une grande variabilité des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (38). C'est cette séquence qui confère à la cellule T la capacité à reconnaître l'association peptide antigénique/molécule du CMH (39).

### **2.3.2 Séquençage des TCR**

La diversité du répertoire des TCR est cruciale pour le fonctionnement du système immunitaire (40). En effet, la majorité des cellules T reconnaissent les Ag présentés dans le contexte HLA par interaction directe avec le TCR. Les technologies de séquençage permettent d'examiner ces répertoires pour en définir notamment la composition clonale. Le clonotype fait référence à la

séquence nucléotidique unique qui survient lors du réarrangement des gènes pour ce récepteur (41). Le répertoire TCR d'un individu sain est polyclonal et provient du processus de recombinaison VDJ, mais est également façonné par l'expansion et la suppression de certains clones après reconnaissance d'un Ag (42). Le répertoire TCR peut être altéré lors d'infections, de troubles auto-immuns ou dans le contexte de tumeurs malignes (40). Le séquençage des TCR a donc toujours suscité un grand intérêt scientifique et les techniques de séquençage nouvelle génération permettent maintenant d'étudier simultanément des millions de molécules d'ADN ainsi que la possibilité de séquencer les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  appariées, permettant une étude approfondie du répertoire TCR (40).

### **2.3.3 Répertoire des lymphocytes T naïfs**

La distribution de la taille des clones du répertoire des TCR naïfs est un déterminant important de l'immunité adaptative. Cette dernière utilise un grand nombre de lymphocytes T exprimant un TCR unique et spécifique. La diversité du répertoire TCR peut être évaluée grâce aux avancées des techniques de séquençage qui permettent de mesurer la diversité clonale et de quantifier les clones enrichis. En effet, bien que non montré en pratique, Robins et al. ont estimé à  $10^6$  le nombre de clonotypes TCR $\beta$  pour les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïves alors que Qi et al., utilisant un autre estimateur statistique, ont estimé ce nombre à  $2 \times 10^8$  (43). Étant donné que la production thymique de nouvelles cellules T diminue en raison de l'involution thymique, c'est la division périphérique des cellules existantes qui constitue la principale source de cellules T naïves chez l'homme adulte (44). Les études réalisées par Thome et al. ont montré une grande hétérogénéité dans la fréquence des séquences de TCR $\beta$  dans des répertoires naïfs. Cette diversité permet de conserver la capacité à répondre à de nouveaux Ag, et ce même à un âge avancé (45).



## 3 Antigènes tumoraux

### 3.1 Immunothérapie adoptive et cancers du sang

Dans les dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans le traitement des leucémies myéloïdes et lymphoblastiques aiguës. Cependant, des rechutes restent fréquentes et il est nécessaire de développer de nouveaux traitements. Ces cancers affectent autant les enfants que les adultes et représentent 29% des cas de leucémies au Canada (statistiques sllcanada, consultées le 26 avril 2020; <https://www.sllcanada.org/faits-et-statistiques/faits-et-statistiques>), de même qu'entre 10 et 15% des hémopathies malignes mondiales (46). L'immunothérapie adoptive, utilisant le répertoire naturel des lymphocytes T (en plus des stratégies utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés), consiste à injecter au patient des cellules immunitaires après leur stimulation et expansion *ex vivo* (47). Il s'agit d'une stratégie prometteuse pour le traitement des patients atteints d'un cancer avancé, réfractaire aux traitements conventionnels ou pour le traitement d'infections virales chez des sujets immunodéprimés à la suite d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou d'un organe solide (48). Des lymphocytes T spécifiques de la tumeur peuvent être isolés à partir du sang périphérique, des ganglions lymphatiques ou des tumeurs solides, puis sont sensibilisés *ex vivo* à un Ag avant d'être injectés au patient pour pallier une réponse immune déficiente. Il existe deux approches principales utilisant l'immunothérapie adoptive, soit l'utilisation de cellules T avec récepteur antigénique chimérique (CART) et la modification des récepteurs des lymphocytes T, telles que décrites à la section 8.3.2 de ce mémoire. Les technologies actuelles permettent d'identifier de nouveaux Ag candidats pouvant servir à l'immunothérapie (49). Les cellules cancéreuses étant des cellules du Soi, les Ag qu'elles expriment sont soumis aux processus de tolérance. Cependant, des Ag uniques, mutés ou d'expression aberrante sont présents dans de nombreuses tumeurs (50).

#### 3.1.1 Inhibiteurs de points de contrôle

Dans les cellules saines, il existe des points de contrôle du cycle cellulaire, permettant de régir la croissance puis la mort des cellules. Lorsque ces points de contrôle sont déréglés, les cellules évoluent vers un état tumoral. Dans la dernière décennie, des molécules appelées inhibiteurs de

points de contrôle (ICI) ont été développées, parmi ceux-ci sont retrouvés un anti-CTLA4 (ipilimumab), des anti-PD1 (tels pembrolizumab et nivolumab) ainsi que des anti-PDL1 (tels atezolizumab et durvalumab). Cette approche a donné des résultats intéressants. En effet, les résultats de MERCK développant un anti-PD1 ont montré, chez des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques, une diminution de la progression de la maladie et de la mortalité de 40% par rapport à des patients traités uniquement par chimiothérapie (51). Un autre inhibiteur de point de contrôle, soit l'ipilimumab, chez des patients atteints de mélanome, a montré une survie un an après le traitement de 54%, diminuant à 32% à deux ans après le traitement (52). Malgré les progrès amenés par ces nouvelles approches, deux défis demeurent ; la durabilité de la réponse ainsi que l'absence de réponse chez 50 à 80% des patients (53). Un potentiel biomarqueur prédictif de la réponse aux ICI est la charge mutationnelle de la tumeur (TMB). Le TMB, mesuré par séquençage de l'ADN, correspond à la mesure du nombre de mutations au sein des cellules tumorales (54). Les tumeurs possédant un TMB élevé devraient donc générer un nombre plus grand de cibles antigéniques, associé avec une augmentation de la reconnaissance par les lymphocytes T, et donc une meilleure réponse aux ICI (55). En effet, Osipov et al. ont ainsi analysé 117 essais cliniques portant sur un total de 12 450 patients traités par ICI et ont trouvé que l'amélioration du taux objectif de réponse était de 21,13% pour les tumeurs avec un TMB élevé ( $\geq 10$  mutations/mégabase) et de 3,73% pour les tumeurs avec un faible TMB ( $< 10$  mutations/mégabase) (56). La combinaison de ces approches innovatrices avec d'autres approches d'immunothérapie pourrait permettre un effet synergique et répondre ainsi aux défis actuels.

### **3.2 Sources d'antigènes**

L'immunothérapie utilise des Ag tumoraux reconnus par les lymphocytes T qui détruiront les cellules tumorales porteuses de ces Ag. Parmi ces derniers sont retrouvés des Ag d'histocompatibilité, des Ag associés aux tumeurs (TAA) et des TSA (50, 57).

Les Ag mineurs d'histocompatibilité (MiHA) sont de courts peptides exprimés à la surface de la cellule, dont l'origine est principalement due au polymorphisme d'un seul nucléotide non-synonyme (ns-SNP), mais peuvent également provenir d'autres mécanismes tels une dégradation alternative du protéasome, de protéines polymorphes créées par des insertions ou délétions dans le

cadre de lecture de transcrits de gènes primaires, de peptides dérivés du chromosome Y ou d'autres chromosomes (58). Ils sont exprimés tant sur des cellules normales que tumorales et peuvent être présentés par les molécules du CMHI et du CMHII. Les réponses cellulaires T contre des MiHA jouent un rôle important dans l'induction de la réaction du greffon contre la tumeur (GVT), mais sont également liées à l'apparition de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (59). En effet, Korngold et Sprent proposèrent en 1978 que l'apparition de GVHD lors de greffes de cellules souches allogéniques était liée aux MiHA (60). Ce sont les observations selon lesquelles ces Ag étaient associés à l'effet GVT et GVHD dans les années 1970 qui ont permis par la suite de mieux comprendre leur distribution tissulaire différentielle afin d'en tirer profit pour une utilisation clinique. Ils peuvent effectivement être exprimés de façon ubiquitaire, ou restreints au système hématopoïétique et aux cellules tumorales (61). HA-1 et HA-2 sont les deux premiers MiHA à être identifiés comme exprimés uniquement sur les cellules hématopoïétiques et dont l'expression est confirmée dans les cellules leucémiques (62). L'utilisation des MiHA en immunothérapie nécessite donc une disparité dans leurs profils d'expression entre les cellules du donneur et du patient, afin que leur expression sur les cellules tumorales d'un patient soit reconnue par les cellules du donneur comme étrangère (57). Cette approche offre une voie thérapeutique prometteuse, mais afin d'être optimale, nécessite un répertoire important de MiHA spécifiques aux cellules tumorales pour éviter les complications associées à la greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques.

Les TAA sont des peptides associés au CMH, dont l'expression est plus importante sur les cellules tumorales que les cellules saines, mais non restreinte à celles-ci. Ces TAA ont pour origine une expression anormale (ou surexpression) de protéines sur des cellules cancéreuses et ont été retrouvés dans plusieurs types de cancers (63). Des exemples de ces Ag sont l'Ag de la tumeur de Wilm 1 (WT1), l'Ag exprimé de façon préférentielle dans le mélanome (PRAME), le carcinome épidermoïde de l'œsophage de New York 1 (NY-ESO-1), qui peuvent être retrouvés seulement à de faibles niveaux dans les tissus sains (62, 64-66). Une classification en quatre sous-groupes a été proposée selon la source antigénique ; Ag codés par les gènes cancéreux de la lignée germinale, Ag de différenciation, Ag surexprimés et Ag viraux (63). L'utilisation des TAA présente l'avantage de pouvoir cibler un grand nombre de patients, mais est limitée dû à son expression dans certains tissus normaux tels les testicules, le placenta, les organes fœtaux et le thymus, participant ainsi au processus de tolérance centrale qui ne permet pas la production de lymphocytes T anti-TAA de

haute affinité (59). Cependant, l'expression anormale des TAA sur les cellules cancéreuses par rapport à celle sur les cellules saines peut permettre au système immunitaire d'en faire la distinction (59).

Les TSA représentent une cible de choix en immunothérapie, car étant jusque-là inconnus du système immunitaire, ils stimulent un répertoire de lymphocytes T de haute affinité, n'ayant été restreint par la sélection thymique et donc n'ayant subi aucun des mécanismes de tolérance au Soi, telle la sélection négative (67). Ces Ag sont spécifiques aux cellules tumorales et donc absents de la surface des cellules normales. Les TSA peuvent être divisés en deux sous-catégories : les Ag mutés spécifiques des tumeurs (mTSA), qui résultent de mutations de l'ADN et les Ag exprimés de façon aberrante spécifiques des tumeurs (aeTSA), qui résultent d'une expression aberrante de transcrits normalement non exprimés dans les tissus sains (68). En effet, il a récemment été démontré que certains lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) reconnaissent des peptides du CMH non mutés, mais restreints aux tumeurs, soit les aeTSA (68, 69). Ces Ag présentent des caractéristiques des MiHA et des mTSA, mais sont également partagés entre différents individus et différentes tumeurs, comme c'est le cas pour les TAA. En effet, Chong et al. ont montré parmi 7 échantillons de mélanome humain et 2 échantillons de cancer du poumon, la présence de 60 TSA cryptiques, dont 40% de ceux-ci sont présents dans plus de 2 échantillons tumoraux (70). De plus, l'analyse de 91 biopsies tumorales et 35 biopsies saines a révélé la présence de 60 TSA cryptiques, dont 25% sont présents dans plus d'une biopsie (70).

### **3.3 Enjeux thérapeutiques**

L'utilisation de lymphocytes T dans le traitement des cancers représente une voie encourageante. En effet, la GVT amenée par la transplantation de cellules hématopoïétiques allogéniques (AHCT) prouve la pertinence de l'utilisation de lymphocytes T contre des leucémies réfractaires aux traitements conventionnels (71). Cependant, les progrès restent limités par la GVHD qui peut survenir suite à la greffe de cellules (72). La découverte et la caractérisation d'Ag sont une avenue prometteuse pour l'immunothérapie afin d'augmenter l'effet GVT, tout en limitant le développement d'une GVHD.

Un exemple de rémission entraînée par l'infusion de lymphocytes T ciblant des TSA est celui observé contre les néoépitopes de fusion BCR-ABL présents dans la leucémie myéloïde chronique et la leucémie lymphoïde aiguë (73). Un autre exemple récent de succès en immunothérapie du cancer est celui des CART dans la leucémie aiguë lymphoblastique. Ces traitements ont recours à l'ingénierie génétique pour cibler la molécule CD19 présente sur les cellules B (74). Une limitation majeure à cette thérapie est l'activation excessive du système immunitaire, qui se traduit par la production rapide et massive de cytokines, appelée syndrome de relâche de cytokines (CRS), pouvant entraîner de nombreuses complications chez le patient (74).

La découverte et la caractérisation de nouvelles cibles antigéniques pouvant produire une réponse thérapeutique demeurent cruciales pour le traitement d'un plus grand nombre de cancers. Ces Ag doivent idéalement être partagés entre différentes tumeurs et différents patients (75). De nombreuses études utilisent « l'immunologie inverse », qui effectue le séquençage de l'exome des cellules tumorales afin d'identifier de nouveaux TSA pour leur utilisation en immunothérapie (76). Ces approches se concentrent cependant sur la découverte de peptides mutés (mTSA) et ne comprennent donc pas les aeTSA (68). De plus, ces études s'intéressent uniquement à l'exome des cellules, représentant seulement 2% du génome humain, alors que la majorité des mutations tumorales se retrouvent dans des régions non codantes (68). Un groupe de chercheurs avec lequel nous collaborons a récemment mis sur pied une technique de protéogénomique afin d'identifier de nouveaux TSA (68). En utilisant des cellules humaines provenant de quatre échantillons d'ALL et de trois échantillons de cancers des poumons, ils ont identifié 22 TSA, dont seulement 2 sont des mTSA alors que les 20 autres sont des aeTSA. De plus, 20 de ces TSA proviennent de régions non codantes. Dans une autre étude, ces chercheurs ont identifié 103 TSA provenant d'échantillons de cancers ovariens séreux de haut grade (HGSC), dont seulement 3 d'entre eux auraient été découverts par les méthodes conventionnelles d'immunologie inverse (77). De ces 103 TSA, 91 sont des aeTSA. Ces nouveaux Ag spécifiques aux tumeurs cryptiques sont codés par des régions extra-exomiques du génome. Leur expression est restreinte aux cellules cancéreuses et amène une réponse de haute affinité par les cellules T qui leur sont spécifiques. Il s'agit d'une source de cibles prometteuses pour l'immunothérapie à cellules T pouvant amener des réponses anti-tumorales fortes, mais des questions se posent encore afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de ces Ag, dont leur capacité immunogène (68, 78).

L'intégration clinique des approches ciblant ces TSA soulève également différents questionnements. Tout d'abord, le moment opportun pour introduire ces stratégies est un élément qui nécessite d'être mieux évalué afin de savoir si seuls les patients en rechute peuvent bénéficier de ces approches ou si une intégration plus précoce pourrait s'avérer plus bénéfique (79). De plus, différentes stratégies peuvent être employées pour utiliser ces Ag sous forme de traitements. La thérapie cellulaire utilisant le clonage des TCR des cellules réactives afin de les injecter dans les cellules T puis chez le patient est une approche intéressante, mais dont le coût engendré ainsi que les difficultés liées à la manipulation des cellules pour la fabrication de ces produits cellulaires doivent être pris en considération (80, 81). L'approche vaccinale est une autre avenue possible, mais dont des questions telles l'identification du bon véhicule, l'intégration de l'information à l'ARN et le couplage au bon HLA devront être étudiées (82, 83).

# **4 T-Cell Immunotherapies Targeting Histocompatibility and Tumor Antigens in Hematological Malignancies**

**Statut :** Publié

**Journal :** Frontiers in Immunology 2020 Feb 21

**Contribution des auteurs :**

La contribution des auteurs se situe à 35% pour CR et 35% pour VJ, à 20% pour JSD ainsi qu'à 5% pour CC et 5% pour SDT.

CR, VJ et JSD : Principaux auteurs, revue de littérature et écriture du manuscrit

CC, SDT : Aide à la revue de la littérature et à l'écriture du manuscrit

CR, VJ, CC, SDT et JSD : Révision et édition du manuscrit

# T-Cell Immunotherapies Targeting Histocompatibility and Tumor Antigens in Hematological Malignancies

Running title : Targeting blood cancer MHC-associated antigens

Valérie Janelle <sup>1\*†</sup>, Caroline Rulleau <sup>1†</sup>, Simon Del Testa <sup>1</sup>, Cédric Carli <sup>1</sup> and  
Jean-Sébastien Delisle <sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada,

<sup>2</sup> Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada,

<sup>3</sup> Division Hématologie et Oncologie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada

This work was supported by the Fonds de Recherche du Québec– Santé (FRQS)–Oncopole, through a team grant (Équipes multiinstitutionnelles contre le cancer) # ONCO-01. The funder was not involved in the preparation of this manuscript. J-SD and VJ respectively hold FRQS clinician-researcher senior career award and post-doctoral fellowship.

J-SD and CC are authors on patents pertaining to the therapeutic use of minor histocompatibility antigens.

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



## **ABSTRACT**

Over the last decades, T-cell immunotherapy has revealed itself as a powerful, and often curative, strategy to treat blood cancers. In hematopoietic cell transplantation, most of the so-called graft-vs.-leukemia (GVL) effect hinges on the recognition of histocompatibility antigens that reflect immunologically relevant genetic variants between donors and recipients. Whether other variants acquired during the neoplastic transformation, or the aberrant expression of gene products can yield antigenic targets of similar relevance as the minor histocompatibility antigens is actively being pursued. Modern genomics and proteomics have enabled the high throughput identification of candidate antigens for immunotherapy in both autologous and allogeneic settings. As such, these major histocompatibility complex-associated tumor-specific (TSA) and tumor-associated antigens (TAA) can allow for the targeting of multiple blood neoplasms, which is a limitation for other immunotherapeutic approaches, such as chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells. We review the current strategies taken to translate these discoveries into T-cell therapies and propose how these could be introduced in clinical practice. Specifically, we discuss the criteria that are used to select the antigens with the greatest therapeutic value and we review the various T-cell manufacturing approaches in place to either expand antigen-specific T cells from the native repertoire or genetically engineer T cells with minor histocompatibility antigen or TSA/TAA-specific recombinant T-cell receptors. Finally, we elaborate on the current and future incorporation of these therapeutic T-cell products into the treatment of hematological malignancies.

**Keywords :** histocompatibility antigens, tumor-specific antigens (TSA), tumor-associated antigens (TAA), transgenic T-cell receptors, T-cell immunotherapy, viral antigens, allogeneic stemcell transplant, chimeric antigen receptor (CAR)

## INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT) remains to this day the most widely used form of cancer cellular immunotherapy. Several studies in both humans and animals have conclusively shown that the recognition of alloantigens by T cells is central to the so-called “graft-vs.-tumor” (GVT) that occurs following AHCT (1–3). However, the recognition by donor T cells of major and minor histocompatibility antigens (MiHA), encoded by germline polymorphisms and expressed on malignant and normal host hematological cells as well as on non-hematological cells, can also result in graft-vs.-host disease (GVHD) (4). Despite several decades of research, the potentially lethal GVHD reactions are still the major limitation to the use of alloreactivity to treat blood cancers with AHCT. Recent antigen identification and characterization methods, coupled with refined cell manipulations and cell transfer procedures, may allow for an effective separation of the GVT and GVHD effects when targeting alloantigens. Moreover, other antigens are inspiring immunotherapeutic strategies that can be implemented in AHCT and non-transplant settings (5). The tumor-specific antigens (TSA) refer to major histocompatibility complex (MHC) class I or II-associated peptides that are found solely at the surface of tumor cells. Often resulting from acquired genetic variants, these antigens can stimulate vigorous T-cell responses and will be extensively described below. T-cell immunotherapies targeting unmutated MHC-associated antigens, including viral antigens and tumor-associated antigens (TAA) will also be described in the context of blood cancers. This review will focus on the current status of immunotherapeutic approaches, particularly those exploiting genetic variants, native and acquired, for the treatment of hematological malignancies. These antigens are almost exclusively relevant to the context of immune therapies using conventional T cells, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>, that recognize their MHC-bound peptide antigen through a T-cell receptor (TCR) composed of an alpha and beta chain (**Figure 1**). T-cell therapies targeting non-polymorphic antigens and the use of other immune cell types will also be briefly discussed and put in context of the current status of cellular immunotherapies for blood neoplasms. The implementation of T-cell therapies targeting relevant antigens for hematological cancers hinges on a detailed knowledge of the targets, T-cell biology, gene engineering, *ex vivo* cell processing methods and clinical expertise. As such, these therapies represent a formidable challenge but also an opportunity to make paradigmatic advances in blood cancer treatment and oncology in general.

## TARGET ANTIGENS IN HEMATOLOGICAL CANCERS

### HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS, MAJORS AND MINORS

AHCT's curative potential relies substantially on the GVT effect, which is largely based on the recognition of histocompatibility antigens by allogeneic T cells. These antigens result from the translation of germline-encoded genetic variants (6–10). However, standard AHCT is a personalized but markedly unspecific form of immunotherapy. The broad repertoire of allogeneic T cells transferred with the graft react against a multitude of host derived antigens. These can be expressed on several cell and tissue types, inducing GVHD in most recipients despite prophylactic immunosuppression (11, 12). Thus, the curative potential of AHCT relies on the transfer of histoincompatible T cells recognizing germline genetic variants on neoplastic cells (13–17). Histocompatibility antigens are prime targets for T cells because they stimulate a high avidity T-cell repertoire. Histocompatibility antigens are not expressed in donor thymus, therefore T cells recognizing histocompatibility antigens with high functional avidity do not undergo negative selection prior their adoptive transfer in patients (18, 19). Moreover, the high frequency of GVHD occurrence in recipient of multiparous female donors hints at the possibility of sensitization to host recipient antigens and the mobilization of a memory T-cell repertoire against these antigens (20). Thus, AHCT patients receive a treatment which is targeted to a mostly unknown set of antigens by an equally elusive T-cell repertoire leading to frequent toxic “on-target/offtumor” immune responses. The discovery and characterization of relevant transplantation antigens nonetheless hold great promise for the design of immunotherapies that could enhance the GVT effect and limit the occurrence of GVHD. The development of such immunotherapies depends on the identification of antigens that are specifically, or at least preferentially, expressed on hematopoietic and/or malignant cells (6, 21). As such, Human leukocyte antigen (HLA) (the major histocompatibility antigens) and MiHA mismatches can be harnessed to treat hematological cancer patients.

The frequency of T cells capable to target mismatched HLA molecules is very high (1–10%) (22–24). Given the likelihood of severe GVHD occurrence when AHCT is performed across HLA barriers, refinements in HLA typing in the last years have improved outcomes due to better matching (25, 26). To this day, HLA compatibility remains a key variable in AHCT and most

centers consider that a related or unrelated HLA identical donor is the best donor. However, recent advances in cell handling and GVHD prophylaxis now enable the use of partially HLA mismatched cord blood and related haploidentical donors, with results that are comparable to those obtained with HLA matched donors (27, 28). In both cases, the risk of GVHD (especially chronic GVHD) is surprising low. Although the reasons for this are incompletely understood, several factors, such as the intensity of the immunosuppression in haplo-identical AHCT, or the intrinsic features of the graft in terms of cell composition and functionality in cord blood transplants, may contribute to this observation (29, 30). Moreover, in certain circumstances, the risk of relapse appears to be lower following these mismatched transplants, arguing in favor of enhanced GVT in these settings (31–33). Based on the presumption that anti-HLA T-cell reactivity is an effective antineoplastic mechanism, the infusion of intentionally mismatched peripheral blood mononuclear cells following chemotherapy is being investigated as a form of immunological consolidation after chemotherapy (34). Such “microtransplantations” resulted in improved leukemia outcomes relative to the usually reported survival and leukemia-free survival rates, despite the absence of prolonged and significant engraftment (35, 36). These results need nonetheless to be confirmed and the underlying mechanisms better defined. Several questions remain about the relative contribution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> HLA-specific T cells and other cell types, such as natural killer (NK) cells in the recognition of HLA-mismatched cellular targets [reviewed in Paul and Lal (37)]. The infusion of HLA mismatched NK cells has led to promising clinical results, confirming a direct anti-neoplastic effect (38, 39). Hence, the respective impacts of T-cell and NK-cell reactivity in HLA mismatched transplants and other cell therapy approaches are still unknown but may account for the effects on GVT and GVHD observed in haplo-identical and cord blood transplants. To this date, no clinical studies using *ex vivo* expanded anti-HLA reactive T cells have been reported. Although this may be fraught with the risk of inducing severe GVHD, the design of anti-HLA T-cell therapy targeting the class II antigens which have a more restricted tissue expression (with high expression in blood cancer subtypes) may be considered (40, 41).

In the context of HLA-matched AHCT, alloreactive donor T cells (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) recognize MHC-bound polymorphic peptides derived from the host proteome and known as the MiHA. Both MHC class I and class II molecules have been shown to present MiHA (2, 6, 42–47). Most of the molecularly characterized MiHA are encoded by autosomal genes that differ between patient and

donor secondary to germline encoded non-synonymous single nucleotide polymorphisms (ns-SNP). However, the true contribution of ns-SNP to MiHA disparities is unknown. Several non-SNP events, such as alternative proteasome degradation, non-presentation of allelic variants, Y-chromosome derived peptides, polymorphic proteins created by frameshift insertions or deletions [reviewed in Griffioen et al. (48)] can also generate MiHA. However, these are more difficult to characterize using currently available methods (45, 49). Recent evidence suggests that the genetic origin of the MiHA presented by MHC class I is not random, with specific exomic regions coding for proteins being overrepresented among the repertoire of MHC-peptides directly assessed by proteomic methods (45, 50). This indicates that relying on nsSNP detection to predict MiHA's sequences is fraught with limitations as only 0.5% of ns-SNP generate MHC-associated peptides (6, 51). More comprehensive proteogenomic analyses, including the direct identification of MHC-associated peptides by mass spectrometry appears to be required to permit the robust, and high-throughput, identification of candidate MiHA that derive from ns-SNP (6, 51). One shortcoming of current methods to define MHC-associated peptides as candidate antigens, is that our current proteomics and bioinformatics tools are better at identifying MHC class I than class II-associated peptides (52, 53). In addition to the confirmation of presentation by the MHC, candidate MiHA for immunotherapy should fulfill several other criteria (**Figure 2**). Perhaps the most important is tissue restriction. In the context of AHCT, the expression of the source protein of a given MiHA should be restricted to the hematopoietic system and the malignant cells. Determining tissue distribution can be achieved through several methods including bioinformatics mining of tissue gene expression atlases to standard biochemical and histological methods (6). Moreover, a practical consideration is that the minor allele frequency (MAF) of a MiHA sequence should be well-balanced in the population to enhance the odds that there will be a mismatch between the donor and recipient. Pre-clinical studies in mice demonstrated the curative potential (without causing GVHD) of injected T cells primed against a single MiHA (54–56) offering solid proof of principle for the development of MiHA-based immunotherapeutics in humans.

### *TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS (TSA)*

The genetic mutations that characterize the neoplastic process can result in acquired ns-SNP with altered reading frames and the translation of proteins with different amino acid sequences (57). Once degraded and presented by MHC molecules at the cell surface, these altered sequences can

be recognized by the host T cells. Since the mutations giving rise to these so-called neoepitopes are present only in cancer cells, the resulting antigens are deemed specific for the tumor. TSA are therefore thought to be most prevalent in highly mutated cancers, such as melanoma and lung cancer. The correlation (albeit very imperfect) between mutation load and responses rates to immune checkpoint (CTLA-4 and PD-1) blockade reinforces the notion that the mutanome is immunologically relevant (6, 58–60). The discovery of TSA has provided new hopes for the field of cancer vaccines with several trials launched in the last decade (61–66). It has also provided a rationale to explain the success of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) infusions in certain cancers (67). The identification of putative patient-specific tumor antigens generated by somatic mutation is unfortunately insufficient as most mutations identified in tumor-expressed genes do not generate neoepitopes capable of stimulating T-cell responses. It has been estimated that only 10% of the non-synonymous mutations in tumor cells can generate mutant peptides with high MHC affinity (68), while only 1% of peptides with high MHC affinity can be recognized by T cells in patients (69). Moreover, a large fraction of these mutations are not shared between patients and often not by all cells comprised in the tumor or metastases (70, 71). Such heterogeneity forces the development of highly personalized approaches for immunotherapy. Unlike many solid tumors, hematologic cancers usually carry a low mutation burden and consequently, TSA are predicted to be much less frequent in these neoplasms (72). However, specific B-cell receptor sequence in B-cell malignancies (idiotype) offer an opportunity to specifically target mature B-cell cancers (73). Likewise, the presence of well-characterized fusion proteins in leukemia, notably the BCR-ABL fusion in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoid leukemia, enabled the demonstration that circulating T cells could recognize neoepitopes created by the fusion (74). The infusion of T cells targeting BCR-ABL fusion epitopes in three acute lymphoid leukemia patients bearing the fusion has been associated with molecular remission and trafficking of the antigen-specific T cells to the bone marrow, hence providing a rationale to pursue the development of TSA-based immunotherapy in blood cancers (75).

It is now increasingly recognized that the acquired genetic variants only represent a fraction of the aberrancies leading to an altered MHC-ligandome on cancer cells. Recent evidence shows that transcription and translation of presumed non-coding genetic regions may significantly alter the immunogenicity of malignant cells. These antigens are different from the wellknown TAA which originate from canonical reading frames that are either overexpressed and/or abnormally expressed

in neoplastic cells (see below). Therefore, a subclassification for TSA has recently been proposed; mutated TSA (mTSA) and aberrantly expressed TSA (aeTSA) (76). The mTSA derive from mutated DNA sequences in canonical genes that can be either exonic or non-exonic (77, 78) and the aeTSA arise from aberrant and cancer-specific expression of unmutated non-canonical transcripts that are not expressed in normal tissues, including thymic medullary cells (mTECs), which has crucial importance for central tolerance. The aeTSA combine the immunological characteristics of MiHA and mTSA, despite being non-polymorphic and shared between individuals and cancer cells like TAA (76, 79). Importantly, aeTSA that derive from unmutated non-exonic sequences (introns, intergenic regions, etc.) may be very abundant, as revealed by proteogenomic methods in human acute lymphoblastic leukemias and lung cancer samples (76, 80).

#### *TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS (TAA)*

Neoplastic cells can overexpress, or aberrantly express, unmutated proteins that are recognized by the immune system (46, 81–83). At present, several TAA have been identified across many cancer types. They are categorized traditionally into four groups: antigens encoded by cancer-gonads genes, embryonic/differentiation genes, overexpressed antigens, and viral antigens. The inclusion of viral antigens as TAA is problematic for several reasons, the most important being that virus-derived antigens are non-self and do not contribute to central tolerance in the thymus like the other TAA. Virus-specific T cells have high functional avidity and have repeatedly been shown to be highly effective for the treatment of Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoma, particularly in the posttransplant setting (84). Despite issues related to central tolerance, TAA can elicit T-cell responses and TAA-specific T cells can be found at high frequency in the circulating T-cell repertoire of normal individuals (79, 85). Several immunotherapies have been devised to target TAA derived from proteins, such as WT1, NY-ESO-1, PRAME, Proteinase 3, MAGE-A3 in blood cancers and despite inherent limitations, TAA have practical advantages for the design of immunotherapies. The most evident being that being non-polymorphic, they are applicable to a large number of patients and can be prepared using standardized reagents.

## *MIHA, TSA, TAA, WHICH TARGETS TO CHOOSE FOR BLOOD CANCER IMMUNOTHERAPY ?*

The ideal antigenic targets should be highly cancer-specific, be universally applicable to all patients and cancer types and enable treatment without the requirement for AHCT. This last decade has seen the rise of anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells which fulfill some of these characteristics (86). Despite excellent clinical results in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and myeloma, current CAR-based approaches are limited to a subset of B-cell antigens [CD19, CD22 (87), B-cell maturation antigen—BCMA (88)]. This is partly because the on-target/off-tumor reactivity leading to normal B-cell depletion is easy to palliate with exogenous gammaglobulins. Targeting other cells, notably those of the myeloid lineage with CAR therapy may prove to be more difficult as the most promising antigens are also expressed by normal progenitor cells. Finally, toxicities related to this therapy are substantial (89). In fact, the cytokine release syndrome (CRS) and neurological toxicities that follow CAR T-cell infusions require careful patient follow up. The CRS involves fever, hypotension and hypoxia that can rapidly degenerate into organ dysfunction if not treated with anti-cytokine therapy. Likewise, seemingly mild cognitive deficits can rapidly degenerate into encephalopathy and seizure if left untreated. Hence, it is likely that pursuing MHC-associated antigens originating from genetic variations, or variations in the expression of unmutated genetic sequences will offer the promise of immunotherapy for the effective and safe treatment of the full spectrum of blood cancers.

Because they are encoded by germline polymorphisms instead of somatic mutations, MiHA possess features that make them attractive for immunotherapy (6). In contrast to TSA, suitable MiHA are more likely to be expressed by all neoplastic cells and applicable to a large number of patients (71, 90, 91). However, this limitation may not be as important if TSA are derived from shared driver mutations or fusion proteins. For both MiHA and TSA, the use of high avidity T-cell repertoires remains a most appealing element. However, devising and implementing immunotherapies targeting shared epitopes is more convenient. This is a major aspect driving TAA-specific strategies. Lastly, aeTSA may be shared by many tumors, while being non-polymorphic and not inducing central immune tolerance. These characteristics would make aeTSA ideal targets, but much more work is needed in order to evaluate the therapeutic potential of these antigens in



humans. The next section will review current and future T-cell therapy strategies (both autologous, and donor-derived in the context of AHCT) directed against these various antigen types.

## **T-CELL IMMUNOTHERAPY STRATEGIES**

The development of methods to identify and characterize MHC-associated antigens resulting from genetic variants is motivated by a strong impetus to design T-cell therapies to treat neoplastic diseases. These T-cell therapies may be used alone or in combination with other approaches, such as vaccination and immune checkpoint blockade but this review focuses on the current status of T-cell therapies aimed at MHC-associated peptides to treat hematological cancers.

T-cell therapies can be antigen agnostic (administered without precise knowledge of the antigens targeted), such as in unmanipulated donor lymphocyte infusions (DLI) and TIL infusion, or targeted to known antigens. The administration of antigen-specific T cells requires prior *ex vivo* manipulations for enrichment and/or expansion of T cells bearing native TCR specific to the targeted antigens. Alternatively, genetic engineering can enable the production of large numbers of TCR transgenic T cells directed against a given antigen.

### *ANTIGEN AGNOSTIC APPROACHES*

The use of DLI has been one of the most conclusive proof of the GVT effect in AHCT (i.e., objective responses following the infusion of donor cells without other treatment). However, the efficacy of donor T cells, collected after AHCT and infused in graded doses, has yielded variable results and has a risk of triggering GVHD in 60–70% of patients (92). There is substantial variability in the response rates to DLI based on the underlying disease [from close to 100% in chronic phase chronic myelogenous leukemia to 15–40% in acute leukemia (93)], the disease burden, the timing of administration (preemptive vs. advanced disease) and the use of concomitant treatments. Most of the experience in DLI was gained in HLA-matched transplant settings, where MiHA mismatches are the drivers of the alloresponses. With no prior knowledge of the number of antigen mismatches, the tissues in which these MiHA source proteins are expressed and the number of MiHA-specific T cells present in the DLI, this form of immunotherapy does not fully harness the potential of MiHA based immunotherapy in AHCT patients. However, it has the advantage of requiring minimal manipulation and thus be rapidly accessible to a large number of AHCT patients.

Other antigen agnostic Tcell therapies have been explored as treatment for solid tumors and blood cancers. An interesting approach is to attempt to exploit T cells harvested from the disease site and reinfuse them after *ex vivo* expansion. TIL therapy was pioneered in solid tumors, in melanoma particularly, where it has yielded high response rates and durable complete remissions (94). This approach is based on the assumption that T-cell populations contained in tumor beds may comprise a high frequency of tumor-reactive cells (95). This principle may also apply for several hematological malignancies. The bone marrow is a natural reservoir of antigen-experienced memory T cells and the site of disease of many blood cancers (96). As such, it may contain a large repertoire of T cells capable of recognizing the malignant hematopoietic cells. Moreover, a practical advantage is that the bone marrow is easily accessible for collection of T cells that can later be expanded *ex vivo*. Expanded autologous “MIL” (marrow infiltrating lymphocytes) from multiple myeloma patients using anti-CD3/CD28 stimulation and IL-2 revealed that the bone marrow contained a high number of myeloma reactive T cells (relative to blood derived T cells from the same patients) capable of targeting both mature and precursor myeloma cells *in vitro* (97). A clinical trial performed in 25 patients confirmed the feasibility of performing “MIL” therapy following autologous stem cell transplant in myeloma patients. The absence of a control group precludes a rigorous assessment of disease response against the standard treatment of this disease, but the authors were able to correlate the presence of antimyeloma activity in the expanded MILs product, as well as the persistence of anti-myeloma reactivity 1 year after infusion, with favorable outcome (98).

The transfer of a large T-cell repertoire has advantages, such as broad applicability as well as the likelihood of targeting several antigens at the same time. However, antigen agnostic methods can miss the relevant targets by expanding/transferring T cells that are not specific for cancer associated/specific antigens (99). In the setting of AHCT and DLI, this can also lead to toxicity in the form of GVHD. The molecular characterization of MiHA, viral antigens, TAA and TSA now permits the development of more precise and possibly more potent T-cell therapies. This, coupled with more widely accessible T-cell manufacturing methods, allows for the use of manipulated T cells targeting MHC-associated targets in blood cancers.

## *MHC-ASSOCIATED ANTIGENS-SPECIFIC APPROACHES IN T-CELL THERAPY*

The current experience using T-cell therapies against MiHA, viral antigens, TSA and TAA demonstrates the possibility to expand antigen-reactive T cells in high numbers to treat patients. However, T-cell manufacturing continues to be challenging and the optimal approach to integrate these therapies in the patients' treatment trajectory remains to be determined. This section reviews the current approaches aiming to treat hematological malignancies through the specific targeting of MHC-associated antigens. A summary of the molecularly defined HLA-associated antigens that have been targeted in adoptive T-cell immunotherapy clinical studies is included in **Table 1** (75, 100–107).

### MIHA

As described above, the MiHA have several conceptual advantages for immunotherapy. Vaccination against MiHA in the context of post-AHCT DLI has been reported to induce detectable MiHA-specific responses in myeloma patients. Although clinical responses were modest (transient regression or stable disease), the vaccination protocol was well-tolerated (108, 109). An alternative approach could be to vaccinate the donors prior to graft collection in order to generate a robust anti-MiHA memory T-cell repertoire in these healthy individuals, as previously done in animal models (55, 110). Unfortunately, this is difficult to envisage for several reasons, including the consequences of allosensitization in donors who may eventually require tissue, cell or organ transplantations themselves.

Cell therapy is the other approach to selectively or preferentially target MiHA. The first trial reporting on a MiHA-specific T-cell therapy strategy used MiHA-specific CD8<sup>+</sup> clones obtained by co-culturing donor T cells with host-derived lymphoblastoid cells (EBV-transformed B-cells) (101). After ruling out reactivity to EBV antigens and host fibroblasts (surrogate for non-hematopoietic tissues), reactive T cells were infused. Thus, although highly specific, this approach did not rely on *a priori* knowledge of the targeted MiHA and their tissue distribution. The administration of these T-cell clones led to objective responses in 5/7 refractory relapsing leukemia patients post-AHCT. These responses were short-lived, with evidence of gradual decrease in antigen expression at disease recurrence in at least one patient, hinting at a plausible immune escape mechanism. A surprising complication was the occurrence of pulmonary toxicity, which is not seen following regular DLI. Although, the MiHA source protein could be detected in the lung tissue in

one case, the patients had also received a conditioning regimen and post-infusion IL-2, which can be associated with pulmonary complications (111). Nonetheless, these findings are an additional argument to select MiHA with restricted expression to the hematopoietic system. Another trial used donor-derived T-cell lines stimulated *ex vivo* with dendritic cells loaded with the blood lineage and HLA-A0201 restricted MiHA HA-1 (100). Following up to 5 rounds of weekly stimulation with antigen loaded dendritic cells in the presence of IL-2, donor derived T-cell lines containing from 11 to  $243 \times 10^6$  HA-1 specific CD8<sup>+</sup> T cells were infused to 3 relapsing patients post-AHCT. Although clearly demonstrating the feasibility of the approach and its innocuity (no notable GVHD), the procedure was not associated with clinical responses.

In both cases, the advanced disease status of the patients and the prolonged period of T cells in culture can be suspected as limiting factors. It was shown that repeated stimulation with antigen-loaded dendritic cells has a detrimental effect, especially for the targeted MiHA-specific T cells relative to the other T cells present in the culture (112). Upon repeated antigen exposure, the MiHA-specific T cells acquired the expression of PD-1 as well as the terminal differentiation marker KLRG-1, which correlated with their relative failure to expand relative to other T cells in the culture. Other research published in the last decade similarly demonstrated that the acquisition of terminal effector T-cell differentiation and exhaustion features *ex vivo*, compromises the further expansion and persistence of the T cells after adoptive transfer. Less-differentiated T cells bearing early memory T-cell features (central memory—T<sub>cm</sub>, or stem cell memory—T<sub>scm</sub>) have been shown to be superior compared to more differentiated T cells in several animal and human pre-clinical models (113–115). It was also shown in humans that exposure to T-cell memory differentiating factors early in the culture can program long term persistence *in vivo* despite the expression of effector or effector memory T-cell differentiation markers at the end of the culture (102). The issue of T-cell differentiation is relevant to the whole field of T-cell immunotherapy and the quest for culture conditions that will preserve or promote early memory expression is an active area of research. Candidate pathways and molecules shown to influence memory differentiation include cytokines [IL-21 (102, 116), TGFβ (117)] and metabolic/developmental pathways [AKT (118), WNT (119)].

Gene engineering is a way to avoid the drawbacks of using elaborate and long cultures to expand antigen-specific T cells. The transfer of a transgenic TCR in T cells can be achieved using brief manufacturing protocols that maintain early T-cell memory differentiation and that generate a high

number of T cells with the desired antigenic specificity. The efficacy and safety of T cells expressing a transgenic HA-1 specific TCR has been established *in vitro* (120). In this study, an elaborate transgene was used for optimal reactivity and safety. The transgene comprised four elements: a TCR specific to HA-1, a CD8 co-receptor to promote the function of the MHC class I restricted TCR in CD4<sup>+</sup> T cells, an inducible caspase 9 safety switch for rapid induction of apoptosis in case of toxicity and a CD34<sup>-</sup>CD20 tag to facilitate the selection of the cells and to track the cells once transferred (121). This design enabled the expression of the TCR in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells which may contribute to CD4<sup>+</sup> T-cell help after transfer. The cells were responsive against different types of primary leukemia cells and cell lines, supporting the further evaluation of HA-1 specific transgenic T cells in clinical trials (NCT03326921). Although the TCR transgenic approach can solve the conundrum of late T-cell differentiation arising in the context of antigen-driven T-cell expansion, it has its own limitations. The production of clinical grade gene therapy vectors is costly and current reports investigating transgenic TCR therapy target only one antigen at a time. TCR transgenic therapies are also limited by the possible mispairing of alpha and beta chain with the endogenous TCR potentially giving rise to unwanted reactivity and toxic allo- or autoimmunity (122, 123). This can be mitigated by the use of murine constant domains, the addition of cysteine residues for preferential pairing of the transgenic chains,  $\alpha/\beta$  chain domain-swapping or the knockdown/out of the endogenous TCR (124–127). However, there is an argument to be made that keeping the endogenous TCR could be beneficial. Chapuis et al. transduced a robust memory EBV-specific T-cell repertoire (which will not cause GVHD) with a TAA-specific TCR transgene in order to leverage the properties of these long term persisting memory cells and use viral reactivations as an adjuvant (103).

Given the possibility for immune escape variants selection following single antigen targeting, the future of MiHAbased therapy may involve multivalent T-cell products (NCT03091933). This emphasizes the importance of discovering and characterizing a large number of MiHA derived from proteins expressed in the hematopoietic system, as well as MiHA presented by enough HLA alleles to treat most, if not all, AHCT patients.

## TSA

The development of T-cell therapies, or vaccines, against TSA or so-called neoantigens is complicated. Identification and validation of neoantigens is time-consuming as well as expensive.

The process of preparing vaccines from tissue samples usually takes several months (62, 63). Finally, the development of TSA-specific T-cell immunotherapy may seem unthinkable given the added complexity of T-cell manufacturing. This being said, several approaches can be taken to leverage TSA identification/prediction and design T-cell immunotherapy. Candidate TSA predicted from mutation analysis have been identified using *in vitro* antigen expression system and coculture with responder autologous TIL (128). Selection and enrichment of these T-cell populations followed by re-expansion represent an attractive strategy to enhance TIL-based, TSA-specific targeting. Interestingly, circulating T cells recognizing neoantigens detected in cancer patients can be found in the peripheral blood of healthy donors (129). In some cases, the cancer naïve repertoire comprises TSA-specific T cells that are not found in the patient TIL which may indicate the loss of certain T-cell clones in cancer patients. Of particular relevance to the development of T-cell therapies, certain mutations within oncogenes occur at the same genetic location, leading to “public” (or shared) T-cell epitopes (130). An example is the G12D *KRAS* gene mutation in digestive cancers, leading to a mutant peptide presented by HLA-C0802 (131). Such “hot-spot” mutations also exist in blood cancers. A recently published study showed that a frequent nucleophosmin 1 mutation in acute myeloid leukemia resulted in the presentation of a neoepitope by HLA-A0201 (132). Finally, given their “public” nature and restricted expression by cancer cells, the aeTSA may represent excellent targets to investigate for the development of T-cell based immunotherapies of hematological malignancies. However, no human studies have been performed to date with aeTSA.

## TAA AND VIRAL ANTIGENS

Adoptive T-cell immunotherapy against viral reactivations occurring after AHCT is highly effective, with response rates globally above 70% in otherwise refractory patients (133, 134). In the case of EBV, which is associated with the development of post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), as well as several lymphoma subtypes outside the context of transplantation, adoptive immunotherapy has a remarkable track record of safety and efficacy (135). Arguably, the prevention or treatment of EBV-associated PTLD after AHCT occurs in the best conditions for T-cell adoptive immunotherapy. The target antigens are foreign, the T cells are expanded (or selected) using multiple antigens from memory T-cell repertoires circulating in immunocompetent healthy donors, who are the original AHCT donors or even partially HLA-matched thirdparty donors. The

resulting T-cell products are polyclonal, can display reactivity against antigens bound by several HLA alleles, usually contain both EBV reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and, depending on the manufacturing protocol, express early memory T-cell markers. The use of peptide libraries containing multiple epitopes derived from several antigenic EBV proteins (such as LMP2, EBNA1, and BZLF1) allow the generation of multivalent T-cell products (136). Virus-specific Tcell lines are effective after AHCT or even solid organ transplant and can be used as prophylaxis in patients at high risk of PTLD with excellent result and no significant GVHD or organ rejection (137–139). The mobilization of the autologous EBV T-cell repertoire in previously treated lymphopenic lymphoma patients outside the context of transplantation requires more elaborate *ex vivo* culture protocols, but is nonetheless feasible and well-tolerated (107). Bollard et al. reported on 29 patients with EBV-associated lymphoma who received the T-cell lines as consolidation following the achievement of remission (one relapse after a median follow up of 3.1 years) and 21 patients who had active disease at the time of infusion. Among these, 13 had clinical responses (11 complete responses) with evidence of T-cell reactivity against the targeted EBV antigens (LMP1, LMP2) and TAA, evoking the possibility of epitope spreading.

Expanding on the success of anti-viral therapy, it was shown that T-cell lines can be generated by stimulating with overlapping peptide libraries of multiple TAA (140). These Tcell lines products were reactive to multiple TAA simultaneously, were polyclonal, displayed early memory T-cell markers and could be generated from both healthy donors and lymphoma patients. Trials are currently testing the clinical effects of such multivalent TAA-targeting T-cell lines in several blood cancer types (NCT02203903, NCT02494167, NCT02475707, NCT02291848, NCT01333046). Because TAA are molecularly defined and non-polymorphic, they are more easily amendable to transgenic TCR therapy. The isolation and cloning of TAA specific TCR restricted by common HLA alleles can yield TCR sequences that can be used in a large population of patients. For the same reasons, TAA have been used in vaccine trials in the setting of various blood cancers including multiple myeloma, lymphoma, and acute myeloid leukemia [reviewed in Avigan and Rosenblatt (141)]. Transgenic TCR therapy against TAA expressed by hematopoietic cancers was also tested in several clinical trials. Transgenic MHC class I restricted TCR against NY-ESO-1/LAGE-1 and MAGE-A3 have been used to treat myeloma patients. In both cases, the TCR were engineered for increased affinity for the MHC-peptide complex as a way to circumvent a limitation of TAA-based immunotherapy as described above. The use of autologous engineered NY-ESO1

specific T cells administered in the context of autologous transplantation resulted in clinical responses in 16/20 patients (106). The adoptively transferred T cells showed expansion as well as trafficking to the bone marrow, and did not cause significant toxicity. Expectedly, loss of antigen or lack of persistence of the transferred T cells were associated with relapse. In the case of MAGE-A3, enhanced affinity TCR transgenic T cells caused unexpected and rapid cardiotoxicity in the first 2 patients recruited on the trial (105). Cross-reactivity with a peptide derived from the heart muscle protein TITIN was the causative mechanism. These trials showed both the promise and perils of using affinity enhanced TCR in cancer adoptive immunotherapy. Native and unaltered TAA-specific TCR gene transfer has also been performed. The transcription factor WT1 is overexpressed in several blood cancers and contributes to several known MHC class I associated epitopes. A first trial involving transgenic WT1 specific TCR has been reported in 2017. The study was performed in patients suffering from refractory acute myelogenous leukemia and high risk myelodysplastic syndromes (104). The treatment involved the administration of two T-cell infusions and post-transfer WT1 vaccination. Eight patients were treated in two dose groups. Two objective, but transient, responses were noted and among the five patients who had persisting circulating engineered T cells, four survived more than 12 months. No significant toxicity was observed. More recently, another study was reported using a different transgenic native (but selected for high affinity) TCR against an HLA-A0201 restricted WT1 peptide and transduced in EBV-specific memory T cells (103). The cells were administered to prevent acute myeloid leukemia relapse after AHCT, when the disease burden is low. With a relapse free survival of 100% at a median of 44 months of follow up (compared to 54% in a concurrent control group), an argument can be made about the importance of administering T-cell therapy early in the treatment trajectory of patients.

## **PERSPECTIVES AND CLINICAL INTEGRATION OF T-CELL THERAPIES**

The opportunities for antigen-specific T-cell immunotherapies are rapidly expanding. The MHC-associated antigens arising from genetic variants, both germline and acquired through the neoplastic process, are prime targets for the treatment of hematological cancers. The genuinely personalized approaches required to translate the complexity and multiplicity of MiHA, TSA, and TAA into therapy is certainly a challenge, but also a great promise. The discovery and



characterization of an increasing number of antigens will enable the design of multivalent therapies capable to target all blood cancers and limit the emergence of immune escape variants associated with single antigen targeting. However, for such promise to materialize, manufacturing processes for these highly personalized therapies will have to be refined and made cost-effective. Nonetheless, T-cell therapies aimed at MHC-associated peptides have the potential to significantly expand existing paradigms in AHCT, autologous cell transfer and other T-cell therapies, such as CAR T cells. Indeed, the development of peptide-MHC specific antibodies may further increase the relevance of characterizing immunogenic MiHA, TAA or shared TSA for CAR-based immunotherapy (142, 143). Along the same lines, genetic variants may also create non-MHC associated cell surface epitopes targetable through recognition by antibodies. Finally, existing CAR may be transduced and expressed in antigen-specific T cells recognizing viral, TAA, MiHA, or TSA through their natural TCR and thus enable dual targeting of malignant cells. The development of multivalent T-cell products, either as a combination of T cells specific for a single antigen or T cells with multiple specificities, will be essential to avoid the emergence of immune escape variants following therapy. In addition, approaches aimed at targeting multiple antigens may prove to be synergistic. For example, pre-clinical studies have shown that only a combination of T cells targeting Ychromosome derived MiHA and TAA could lead to tumor regression. A threshold effect may be required to generate enough inflammation to support effective anti-cancer immunity (144, 145). Similarly, this is likely achieved in AHCT settings by Y-chromosome antigen-specific T cells given the increased GVT and GVHD effects noted after female into male transplants (146). Another possible benefit of inducing strong immune responses is the development of epitope spreading as evoked by the appearance of detectable anti-TAA responses following microtransplantation, AHCT or anti-viral T-cell therapy (147, 148). Along the same lines, the combination of T-cell therapy with other immunotherapeutic interventions is also likely to unveil important synergies. To this end, the administration of vaccines to consolidate the response after adoptive transfer, or immune checkpoint inhibitor therapy following adoptive T-cell infusion, are actively investigated. The timing of administration of T-cell therapies will need to be better studied (**Figure 3**). Cell therapies remain largely offered to refractory patients. However, the promising results following prophylactic DLI (149, 150), anti-viral Tcell lines (137) and more recently transgenic TCR therapy (103), suggest that T-cell therapies should not be confined to the treatment of relapsing patients. In fact, these treatments are probably more potent in the context of low burden disease. The reassuring

safety profile of several of the approaches targeting MHC-associated peptides should facilitate the introduction of T-cell therapies earlier on during the patient's course.

Several scientific and methodological issues remain to be addressed to improve T-cell therapies directed against MHC-associated peptides or the MHC molecule itself. A significant contributor to the response against genetic variants is CD4<sup>+</sup> T-cell mediated, but most identified MiHA, TAA and TSA are MHC class I associated peptides (151). Although challenging, the identification of MHC class II restricted responses will likely be essential to optimize T-cell therapies. This should be a major area of research in the upcoming years.

The downregulation or loss of MHC expression, the genetic loss or silencing of antigen source protein are well-known immune escape mechanisms in cancer. This can be fairly extensive as described in haplo-identical transplants, where the loss of the entire mismatched haplotype can be observed (152). Elaborate strategies targeting MHC-associated peptides presented by different alleles and belonging to different haplotypes may be necessary to harness the therapeutic potential of T-cell immunotherapy against genetic variants translated into MHC-associated peptides. Moreover, an attractive combination approach is to maximize antigen presentation through epigenetic modulation. Demethylating agents, histone deacetylase inhibitors and methyltransferase inhibitors are established or investigational drugs for the treatment of blood cancers. It is increasingly recognized that these also promote gene expression that increases the immunogenicity of malignant cells and also affect immune cell physiology [reviewed in Lindblad et al. (153)]. These effects have been reported to occur through multiple mechanisms like cytokine expression, as well as upregulation of the MHC and associated antigens (154, 155). This last aspect is particularly intriguing as both TAA and cryptic aeTSA antigens have been shown to be promoted by epigenetic modulation (156–159). Notably, extra-exomic endogenous retroviral elements which are attractive as a source of specific and robust cancer antigens can be expressed through modulation of methylation. However, as a note of caution, there is conflicting reports on the outcome of epigenetic modifiers on the physiology of immune cells. Among others, regulatory T cells and the expression of immune checkpoints can be promoted by these agents, perhaps inviting for further combinations with immune modulators.

To conclude, the field is increasingly confronted with multiple antigens and approaches to target them. Careful selection of the best targets will need more research and rational combinations therapies are likely to be required for these antigens to reveal their full potential.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank the funder (FRQS-Oncopole) as well as the colleagues at the Hôpital Maisonneuve-Rosemont for stimulating discussions.

## REFERENCES

1. Dickinson AM, Norden J, Li S, Hromadnikova I, Schmid C, Schmetzer H, et al. Graft-versus-leukemia effect following hematopoietic stem cell transplantation for leukemia. *Front Immunol.* (2017) 8:496. doi: 10.3389/fimmu.2017.00496
2. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versusleukaemia effect. *Nat Rev Cancer.* (2004) 4:371–80. doi: 10.1038/nrc1365
3. Falkenburg JHF, Warren EH. Graft versus leukemia reactivity after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2011) 17:S33–8. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.11.009
4. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* (2009) 373:1550–61. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60237-3
5. Vigneron N. Human tumor antigens and cancer immunotherapy. *Biomed Res Int.* (2015) 2015:948501. doi: 10.1155/2015/948501
6. Granados DP, Rodenbrock A, Laverdure JP, Cote C, Caron-Lizotte O, Carli C, et al. Proteogenomic-based discovery of minor histocompatibility antigens with suitable features for immunotherapy of hematologic cancers. *Leukemia.* (2016) 30:1344–54. doi: 10.1038/leu.2016.22
7. Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med.* (2005) 11:1244–9. doi: 10.1038/nm1309
8. Vincent K, Roy DC, Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood.* (2011) 118:2951–9. doi: 10.1182/blood-2011-04-350868
9. Mutis T, Brand R, Gallardo D, van Biezen A, Niederwieser D, Goulmy E. Graft-versus-host driven graft-versus-leukemia effect of minor histocompatibility antigen HA-1 in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia.* (2010) 24:1388. doi: 10.1038/leu.2010.115
10. Jenq RR, van den Brink MR. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* (2010) 10:213–21. doi: 10.1038/nrc2804
11. Warren EH, Zhang XC, Li S, Fan W, Storer BE, Chien JW, et al. Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood.* (2012) 120:2796–806. doi: 10.1182/blood-2012-04-347286

12. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol.* (2012) 12:443–58. doi: 10.1038/nri3212
13. Hombrink P, Hadrup SR, Bakker A, Kester MG, Falkenburg JH, von dem Borne PA, et al. High-throughput identification of potential minor histocompatibility antigens by MHC tetramer-based screening: feasibility and limitations. *PLoS ONE.* (2011) 6:e22523. doi: 10.1371/journal.pone.0022523
14. Marijt WA, Heemskerk MH, Kloosterboer FM, Goulmy E, Kester MG, vander Hoorn MA, 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 USA.* (2003) 100:2742–7. doi: 10.1073/pnas.0530192100
15. de Rijke B, van Horssen-Zoetbrood A, Beekman JM, Otterud B, Maas F, Woestenenk R, et al. A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia. *J Clin Invest.* (2005) 115:3506–16. doi: 10.1172/JCI24832
16. Slager EH, Honders MW, van der Meijden ED, van LuxemburgHeijs SA, Kloosterboer FM, Kester MG, et al. Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer. *Blood.* (2006) 107:4954–60. doi: 10.1182/blood-2005-09-3883
17. van BergenCAM, Kester MGD, Jedema I, Heemskerk MHM, van Luxemburg-Heijs SAP, Kloosterboer FM, et al. Multiple myeloma–reactive T cells recognize an activation-induced minor histocompatibility antigen encoded by the ATP-dependent interferon-responsive (ADIR) gene. *Blood.* (2007) 109:4089. doi: 10.1182/blood-2006-08-043935
18. Inglesfield S, Cosway EJ, Jenkinson WE, Anderson G. Rethinking thymic tolerance: lessons from mice. *Trends Immunol.* (2019) 40:279–91. doi: 10.1016/j.it.2019.01.011
19. Passos GA, Speck-Hernandez CA, Assis AF, Mendes-da-Cruz DA. Update on aire and thymic negative selection. *Immunology.* (2018) 153:10–20. doi: 10.1111/imm.12831
20. Loren AW, Bunin GR, Boudreau C, Champlin RE, Cnaan A, Horowitz MM, et al. Impact of donor and recipient sex and parity on outcomes of HLA-identical sibling allogeneic

- hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2006) 12:758–69. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.03.015
21. Bauer J, Nelde A, Bilich T, Walz JS. Antigen targets for the development of immunotherapies in leukemia. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:1397. doi: 10.3390/ijms20061397
  22. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T lymphocytes and allograft rejection. *Front Immunol.* (2016) 7:582. doi: 10.3389/fimmu.2016.00582
  23. DeWolf S, Sykes M. Alloimmune T cells in transplantation. *J Clin Invest.* (2017) 127:2473–81. doi: 10.1172/JCI90595
  24. D’Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis IIN, Claas FHJ. TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition. *Immunogenetics.* (2012) 64:77–85. doi: 10.1007/s00251-011-0590-0
  25. Mayor NP, Hayhurst JD, Turner TR, Szydlo RM, Shaw BE, Bultitude WP, et al. Recipients receiving better HLA-matched hematopoietic cell transplantation grafts, uncovered by a novel HLA typing method, have superior survival: a retrospective study. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2019) 25:443–50. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.12.768
  26. Allen ES, Yang B, Garrett J, Ball ED, Maiers M, Morris GP. Improved accuracy of clinical HLA genotyping by next-generation DNA sequencing affects unrelated donor search results for hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol.* (2018) 79:848–54. doi: 10.1016/j.humimm.2018.10.008
  27. Barker JN, Kurtzberg J, Ballen K, Boo M, Brunstein C, Cutler C, et al. Optimal practices in unrelated donor cord blood transplantation for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2017) 23:882–96. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.03.006
  28. Fabricius WA, Ramanathan M. Review on haploidentical hematopoietic cell transplantation in patients with hematologic malignancies. *Adv Hematol.* (2016) 2016:5726132. doi: 10.1155/2016/5726132
  29. Yun DH, Varma A, Hussain JM, Nathan S, Brunstein C. Clinical relevance of immunobiology in umbilical cord blood transplantation. *J Clin Med.* (2019) 8:E1968. doi: 10.3390/jcm8111968
  30. Rashidi A, Hamadani M, Zhang M-J, Wang H-L, Abdel-Azim H, Aljurf M, et al. Outcomes of haploidentical vs matched sibling transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission. *Blood Adv.* (2019) 3:1826–36. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000050

31. Milano F, Boelens JJ. Stem cell comparison: what can we learn clinically from unrelated cord blood transplantation as an alternative stem cell source? *Cytotherapy*. (2015) 17:695–701. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.03.003
32. Verneris MR, Brunstein CG, Barker J, MacMillan ML, DeFor T, McKenna DH, et al. Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood*. (2009) 114:4293–9. doi: 10.1182/blood-2009-05-220525
33. Ahmed S, Kanakry JA, Ahn KW, Litovich C, Abdel-Azim H, Aljurf M, et al. Lower Graft-versus-host disease and relapse risk in posttransplant cyclophosphamide-based haploidentical versus matched sibling donor reduced-intensity conditioning transplant for hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. (2019) 25:1859–68. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.05.025
34. Krakow EF, Bergeron J, Lachance S, Roy D-C, Delisle J-S. Harnessing the power of alloreactivity without triggering graft-versus-host disease: how non-engrafting alloreactive cellular therapy might change the landscape of acute myeloid leukemia treatment. *Blood Rev*. (2014) 28:249–61. doi: 10.1016/j.blre.2014.08.002
35. Guo M, Chao NJ, Li J-Y, Rizzieri DA, Sun Q-Y, Mohrbacher A, et al. HLA-mismatched microtransplant in older patients newly diagnosed with acute myeloid leukemia: results from the Microtransplantation Interest Group. *JAMA Oncol*. (2018) 4:54–62. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.2656
36. Guo M, Hu K-X, Yu C-L, Sun Q-Y, Qiao J-H, Wang D-H, et al. Infusion of HLA-mismatched peripheral blood stem cells improves the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia in elderly patients. *Blood*. (2011) 117:936–41. doi: 10.1182/blood-2010-06-288506
37. Paul S, Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. (2017) 8:1124. doi: 10.3389/fimmu.2017.01124
38. Fehniger TA, Miller JS, Stuart RK, Cooley S, Salhotra A, Curtsinger J, et al. A phase 1 trial of CNDO-109-activated natural killer cells in patients with high-risk acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. (2018) 24:1581–9. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.03.019
39. Bachanova V, Sarhan D, DeFor TE, Cooley S, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, et al. Haploidentical natural killer cells induce remissions in non-Hodgkin lymphoma patients with

- low levels of immunosuppressor cells. *Cancer Immunol Immunother.* (2018) 67:483–94. doi: 10.1007/s00262-017-2100-1
40. Lamers CHJ, Wijers R, van Bergen CAM, Somers JAE, Braakman E, Gratama JW, et al. CD4<sup>+</sup> T-cell alloreactivity toward mismatched HLA class II alleles early after double umbilical cord blood transplantation. *Blood.* (2016) 128:2165–74. doi: 10.1182/blood-2016-06-718619
41. Stevanovic S, Nijmeijer BA, van Schie MLJ, Salvatori DCF, Maas S, Griffioen M, et al. Donor T cells administered over HLA class II barriers mediate antitumor immunity without broad off-target toxicity in a NOD/scid mouse model of acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2013) 19:867–75. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.03.003
42. Roopenian D, Choi EY, Brown A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev.* (2002) 190:86–94. doi: 10.1034/j.1600-065X.2002.19007.x
43. Mullally A, Ritz J. Beyond HLA: the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* (2007) 109:1355. doi: 10.1182/blood-2006-06-030858
44. Granados DP, Laumont CM, Thibault P, Perreault C. The nature of self for T cells—a systems-level perspective. *Curr Opin Immunol.* (2015) 34:1–8. doi: 10.1016/j.coi.2014.10.012
45. Roy DC, Perreault C. Major vs minor histocompatibility antigens. *Blood.* (2017) 129:664–6. doi: 10.1182/blood-2016-12-754515
46. Zilberberg J, Feinman R, Korngold R. Strategies for the identification of T cell-recognized tumor antigens in hematological malignancies for improved graft-versus-tumor responses after allogeneic blood and marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2015) 21:1000–7. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.11.001
47. Sherwood RA, Brent L, Rayfield LS. Presentation of alloantigens by host cells. *Eur J Immunol.* (1986) 16:569–74. doi: 10.1002/eji.1830160519
48. Griffioen M, van Bergen CAM, Falkenburg JHF. Autosomal minor histocompatibility antigens: how genetic variants create diversity in immune targets. *Front Immunol.* (2016) 7:100. doi: 10.3389/fimmu.2016.00100
49. McCarroll SA, Bradner JE, Turpeinen H, Volin L, Martin PJ, Chilewski SD, et al. Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease. *Nat Genet.* (2009) 41:1341–4. doi: 10.1038/ng.490



50. Pearson H, Daouda T, Granados DP, Durette C, Bonneil E, Courcelles M, et al. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J Clin Invest.* (2016) 126:4690–701. doi: 10.1172/JCI88590
51. Granados DP, Sriranganadane D, Daouda T, Zieger A, Laumont CM, CaronLizotte O, et al. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat Commun.* (2014) 5:3600. doi: 10.1038/ncomms4600
52. Abelin JG, Keskin DB, Sarkizova S, Hartigan CR, Zhang W, Sidney J, et al. Mass spectrometry profiling of HLA-associated peptidomes in mono-allelic cells enables more accurate epitope prediction. *Immunity.* (2017) 46:315–26. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.007
53. Gfeller D, Bassani-Sternberg M. Predicting antigen presentation-what could we learn from a million peptides? *Front Immunol.* (2018) 9:1716. doi: 10.3389/fimmu.2018.01716
54. Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med.* (2001) 7:789–94. doi: 10.1038/89907
55. Meunier M-C, Delisle J-S, Bergeron J, Rineau V, Baron C, Perreault C. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med.* (2005) 11:1222–9. doi: 10.1038/nm1311
56. Li N, Matte-Martone C, Zheng H, Cui W, Venkatesan S, Tan HS, et al. Memory T cells from minor histocompatibility antigen-vaccinated and virus-immune donors improve GVL and immune reconstitution. *Blood.* (2011) 118:5965. doi: 10.1182/blood-2011-07-367011
57. Srivastava PK. Neoepitopes of cancers: looking back, looking ahead. *Cancer Immunol Res.* (2015) 3:969–77. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0134
58. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science.* (2015) 348:56. doi: 10.1126/science.aaa8172
59. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med.* (2014) 371:2189–99. doi: 10.1056/NEJMoa14 06498
60. Hellmann MD, Ciuleanu T-E, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, AudigierValette C, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. *N Engl J Med.* (2018) 378:2093–104. doi: 10.1056/NEJMoa1801946

61. Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, Kaabinejadian S, Hundal J, PettiAA, et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science*. (2015) 348:803–8. doi: 10.1126/science.aaa3828
62. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*. (2017) 547:217–21. doi: 10.1038/nature22991
63. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Lower M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. (2017) 547:222–6. doi: 10.1038/nature23003
64. Keskin DB, Anandappa AJ, Sun J, Tirosh I, Mathewson ND, Li S, et al. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature*. (2019) 565:234–9. doi: 10.1038/s41586-018-0792-9
65. Hilf N, Kuttruff-Coqui S, Frenzel K, Bukur V, Stevanovic S, Gouttefangeas C, et al. Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature*. (2019) 565:240–5. doi: 10.1038/s41586-018-0810-y
66. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*. (2012) 482:400–4. doi: 10.1038/nature10755
67. Lu Y-C, Yao X, Crystal JS, Li YF, El-Gamil M, Gross C, et al. Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. *Clin Cancer Res*. (2014) 20:3401–10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0433
68. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. (2017) 541:321. doi: 10.1038/nature21349
69. Kristensen VN. The antigenicity of the tumor cell—context matters. *N Engl J Med*. (2017) 376:491–3. doi: 10.1056/NEJMcibr1613793
70. Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F. Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy. *Front Immunol*. (2018) 9:14. doi: 10.3389/fimmu.2018.00014
71. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. (2015) 348:69–74. doi: 10.1126/science.aaa4971
72. Galanina N, Bejar R, Choi M, Goodman A, Wieduwilt M, Mulroney C, et al. Comprehensive genomic profiling reveals diverse but actionable molecular portfolios across hematologic

- malignancies: implications for next generation clinical trials. *Cancers (Basel)*. (2018) 11:11. doi: 10.3390/cancers11010011
73. Jacobsen J, Haabeth O-AW, Tveita AA, Schjetne KW, Munthe LA, Bogen B. Naive idiotope-specific B and T cells collaborate efficiently in the absence of dendritic cells. *J Immunol*. (2014) 192:4174. doi: 10.4049/jimmunol.1302359
  74. Rezvani K, Grube M, Brenchley JM, Sconocchia G, Fujiwara H, Price DA, 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) 102:2892–900. doi: 10.1182/blood-2003-01-0150
  75. Comoli P, Basso S, Riva G, Barozzi P, Guido I, Gurrado A, et al. BCR-ABL-specific T-cell therapy in Ph<sup>+</sup> ALL patients on tyrosinekinase inhibitors. *Blood*. (2017) 129:582–6. doi: 10.1182/blood-2016-07-731091
  76. Laumont CM, Vincent K, Hesnard L, Audemard É, Bonneil É, Laverdure J-P, et al. Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci Transl Med*. (2018) 10:eaau5516. doi: 10.1126/scitranslmed.aau5516
  77. Guilloux Y, Lucas S, Brichard VG, Van Pel A, Viret C, De Plaen E, et al. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med*. (1996) 183:1173. doi: 10.1084/jem.183.3.1173
  78. Khurana E, Fu Y, Chakravarty D, Demichelis F, Rubin MA, Gerstein M. Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nat Rev Genet*. (2016) 17:93. doi: 10.1038/nrg.2015.17
  79. Schuster H, Peper JK, Bosmuller HC, Rohle K, Backert L, Bilich T, et al. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2017) 114:E9942–51. doi: 10.1073/pnas.1707658114
  80. Ehx G, Perreault C. Discovery and characterization of actionable tumor antigens. *Genome Med*. (2019) 11:29. doi: 10.1186/s13073-019-0642-x
  81. Spaapen R, Mutis T. Targeting haematopoietic-specific minor histocompatibility antigens to distinguish graft-versus-tumour effects from graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. (2008) 21:543–57. doi: 10.1016/j.beha.2008.06.001

82. Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumorantigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol.* (2007) 178:1975. doi: 10.4049/jimmunol.178.4.1975
83. Kessler JH, Melief CJM. Identification of T-cell epitopes for cancerimmunotherapy. *Leukemia.* (2007) 21:1859–74. doi: 10.1038/sj.leu.2404787
84. Toner K, Bollard CM, Dave H. T-cell therapies for T-cell lymphoma. *Cytotherapy.* (2019) 21:935–42. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.04.058
85. Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, Speiser DE, Liénard D, Lejeune F, et al. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med.* (1999) 190:705–15. doi: 10.1084/jem.190.5.705
86. Jacoby E, Shahani SA, Shah NN. Updates on CAR T-cell therapy in B-cell malignancies. *Immunol Rev.* (2019) 290:39–59. doi: 10.1111/imr.12774
87. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med.* (2018) 24:20–8. doi: 10.1038/nm.4441
88. Brudno JN, Maric I, Hartman SD, Rose JJ, Wang M, Lam N, et al. T cells genetically modified to express an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol.* (2018) 36:2267–80. doi: 10.1200/JCO.2018.77.8084
89. Cummins KD, Gill S. Will CAR T cell therapy have a role in AML? Promises and pitfalls. *Semin Hematol.* (2019) 56:155–63. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.008
90. Yadav M, Jhunjhunwala S, Phung QT, Lupardus P, Tanguay J, Bumbaca S, et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature.* (2014) 515:572–6. doi: 10.1038/nature14001
91. Spierings E, Hendriks M, Absi L, Canossi A, Chhaya S, Crowley J, et al. Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations. *PLoS Genet.* (2007) 3:e103. doi: 10.1371/journal.pgen.0030103

92. Scarisbrick JJ, Dignan FL, Tulpule S, Gupta ED, Kolade S, Shaw B, et al. Amulticentre UK study of GVHD following DLI: rates of GVHD are high but mortality from GVHD is infrequent. *Bone Marrow Transplant.* (2015) 50:62–7. doi: 10.1038/bmt.2014.227
93. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsedhematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev.* (2010) 36:528–38. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.03.004
94. Yang JC, Rosenberg SA. Adoptive T-cell therapy for cancer. *Adv Immunol.* (2016) 130:279–94. doi: 10.1016/bs.ai.2015.12.006
95. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptiveimmunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* (1986) 233:1318. doi: 10.1126/science.3489291
96. Di Rosa F, Gebhardt T. Bone marrow T cells and the integrated functions of recirculating and tissue-resident memory T cells. *Front Immunol.* (2016) 7:51. doi: 10.3389/fimmu.2016.00051
97. Noonan K, Matsui W, Serafini P, Carbley R, Tan G, Khalili J, et al. Activated marrow-infiltrating lymphocytes effectively target plasma cells and their clonogenic precursors. *Cancer Res.* (2005) 65:2026. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3337
98. Noonan KA, Huff CA, Davis J, Lemas MV, Fiorino S, Bitzan J, et al. Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma. *Sci Transl Med.* (2015) 7:288ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7014
99. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8<sup>+</sup> tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest.* (2014) 124:2246–59. doi: 10.1172/JCI73639
100. Meij P, Jedema I, van der Hoorn MAWG, Bongaerts R, Cox L, Wafelman AR, et al. Generation and administration of HA-1-specific T-cell lines for the treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation: a pilot study. *Haematologica.* (2012) 97:1205–8. doi: 10.3324/haematol.2011.053371
101. Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood.* (2010) 115:3869–78. doi: 10.1182/blood-2009-10-248997

102. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, Chaney CN, Pufnock JS, Schmitt TM, et al. Transferred WT1-reactive CD8<sup>+</sup> T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med.* (2013) 5:174ra27. doi: 10.1126/scitranslmed.3004916
103. Chapuis AG, Egan DN, Bar M, Schmitt TM, McAfee MS, Paulson KG, et al. T cell receptor gene therapy targeting WT1 prevents acute myeloid leukemia relapse post-transplant. *Nat Med.* (2019) 25:1064–72. doi: 10.1038/s41591-019-0472-9
104. Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, Fujiwara H, Nishida T, Akatsuka Y, et al. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene–transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood.* (2017) 130:1985–94. doi: 10.1182/blood-2017-06-791202
105. Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L, et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood.* (2013) 122:863–71. doi: 10.1182/blood-2013-03-490565
106. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med.* (2015) 21:914–21. doi: 10.1038/nm.3910
107. Bollard CM, Gottschalk S, Torrano V, Diouf O, Ku S, Hazrat Y, et al. Sustained complete responses in patients with lymphoma receiving autologous cytotoxic T lymphocytes targeting Epstein-Barr virus latent membrane proteins. *J Clin Oncol.* (2014) 32:798–808. doi: 10.1200/JCO.2013.51.5304
108. Oostvogels R, Kneppers E, Minnema MC, Doorn RC, Franssen LE, Aarts T, et al. Efficacy of host-dendritic cell vaccinations with or without minor histocompatibility antigen loading, combined with donor lymphocyte infusion in multiple myeloma patients. *Bone Marrow Transplant.* (2017) 52:228–37. doi: 10.1038/bmt.2016.250
109. Franssen LE, Roeven MWH, Hobo W, Doorn R, Oostvogels R, Falkenburg JHF, et al. A phase I/II minor histocompatibility antigen-loaded dendritic cell vaccination trial to safely improve the efficacy of donor lymphocyte infusions in myeloma. *Bone Marrow Transplant.* (2017) 52:1378–83. doi: 10.1038/bmt.2017.118

110. Delisle J-S, Gaboury L, Bélanger M-P, Tassé É, Yagita H, Perreault C. Graft-versus-host disease causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in interferon- $\gamma$  receptor-deficient hosts. *Blood*. (2008) 112:2111–9. doi: 10.1182/blood-2007-12-130534
111. Dutcher JP, Schwartzentruber DJ, Kaufman HL, Agarwala SS, Tarhini AA, Lowder JN, et al. High dose interleukin-2 (aldesleukin)—expert consensus on best management practices-2014. *J Immunother Cancer*. (2014) 2:26. doi: 10.1186/s40425-014-0026-0
112. Janelle V, Carli C, Taillefer J, Orio J, Delisle J-S. Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *J Transl Med*. (2015) 13:123. doi: 10.1186/s12967-015-0495-z
113. Crompton JG, Sukumar M, Restifo NP. Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunol Rev*. (2014) 257:264–76. doi: 10.1111/imr.12135
114. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. (2011) 17:1290. doi: 10.1038/nm.2446
115. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2005) 102:9571. doi: 10.1073/pnas.0503726102
116. Orio J, Carli C, Janelle V, Giroux M, Taillefer J, Goupil M, et al. Early exposure to interleukin-21 limits rapidly generated anti-Epstein-Barr virus T-cell line differentiation. *Cytotherapy*. (2015) 17:496–508. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.12.009
117. Dahmani A, Janelle V, Carli C, Richaud M, Lamarche C, Khalili M, et al. TGF $\beta$  Programs central memory differentiation in *ex vivo*–stimulated human T cells. *Cancer Immunol Res*. (2019) 7:1426–39. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0691
118. van der Waart AB, van de Weem NMP, Maas F, Kramer CSM, Kester MGD, Falkenburg JHF, et al. Inhibition of Akt signaling promotes the generation of superior tumor-reactive T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*. (2014) 124:3490–500. doi: 10.1182/blood-2014-05-578583
119. Gattinoni L, Zhong X-S, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8<sup>+</sup> memory stem cells. *Nat Med*. (2009) 15:808–13. doi: 10.1038/nm.1982

120. Dossa RG, Cunningham T, Sommermeyer D, Medina-Rodriguez I, Biernacki MA, Foster K, et al. Development of T-cell immunotherapy for hematopoietic stem cell transplantation recipients at risk of leukemia relapse. *Blood*. (2018) 131:108–20. doi: 10.1182/blood-2017-07-791608
121. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. (2011) 365:1673–83. doi: 10.1056/NEJMoa1106152
122. van Loenen MM, de Boer R, Amir AL, Hagedoorn RS, Volbeda GL, Willemze R, et al. Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107:10972–7. doi: 10.1073/pnas.1005802107
123. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, Jorritsma A, et al. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med*. (2010) 16:565–70. doi: 10.1038/nm.2128
124. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res*. (2006) 66:8878–86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1450
125. Kuball J, Dossett ML, Wolfl M, Ho WY, Voss R-H, Fowler C, et al. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood*. (2007) 109:2331–8. doi: 10.1182/blood-2006-05-023069
126. Legut M, Dolton G, Mian AA, Ottmann OG, Sewell AK. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells. *Blood*. (2018) 131:311–22. doi: 10.1182/blood-2017-05-787598
127. Bethune MT, Gee MH, Bunse M, Lee MS, Gschweng EH, Pagadala MS, et al. Domain-swapped T cell receptors improve the safety of TCR gene therapy. *Elife*. (2016) 5:e19095. doi: 10.7554/eLife.19095.020
128. Parkhurst M, Gros A, Pasetto A, Prickett T, Crystal JS, Robbins P, et al. Isolation of T-cell receptors specifically reactive with mutated tumor-associated antigens from tumor-infiltrating lymphocytes based on CD137 expression. *Clin Cancer Res*. (2017) 23:2491–505. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2680



129. Strønen E, Toebes M, Kelderman S, van Buuren MM, Yang W, van RooijN, et al. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. *Science*. (2016) 352:1337. doi: 10.1126/science.aaf2288
130. Lo W, Parkhurst M, Robbins PF, Tran E, Lu Y-C, Jia L, et al. Immunologic recognition of a shared p53 mutated neoantigen in a patient with metastatic colorectal cancer. *Cancer Immunol Res*. (2019) 7:534–43. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0686
131. Tran E, Robbins PF, Lu Y-C, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, et al. T-cell transfertherapy targeting mutant KRAS in cancer. *N Engl J Med*. (2016) 375:2255–62. doi: 10.1056/NEJMoa1609279
132. van der Lee DI, Reijmers RM, Honders MW, Hagedoorn RS, de JongRC, Kester MG, et al. Mutated nucleophosmin 1 as immunotherapy target in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. (2019) 129:774–85. doi: 10.1172/JCI97482
133. Baugh KA, Tzannou I, Leen AM. Infusion of cytotoxic T lymphocytesfor the treatment of viral infections in hematopoetic stem cell transplant patients. *Curr Opin Infect Dis*. (2018) 31:292–300. doi: 10.1097/QCO.0000000000000456
134. Doubrovina E, Oflaz-Sozmen B, Prockop SE, Kernan NA, AbramsonS, Teruya-Feldstein J, et al. Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV<sup>+</sup> lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. (2012) 119:2644–56. doi: 10.1182/blood-2011-08-371971
135. Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE. T-cell therapy in the treatment of posttransplant lymphoproliferative disease. *Nat Rev Clin Oncol*. (2012) 9:510–9. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.111
136. Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, Yanagisawa R, Christin AS, Huye LE, et al. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther*. (2012) 20:1622–32. doi: 10.1038/mt.2012.130
137. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, Hale GA, Rousseau A, Smith CA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*. (2010) 115:925–35. doi: 10.1182/blood-2009-08-2 39186
138. Savoldo B, Goss JA, Hammer MM, Zhang L, Lopez T, Gee AP, et al. Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus–specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Blood*. (2006) 108:2942–9. doi: 10.1182/blood-2006-05-021782

139. Haque T, McAulay KA, Kelly D, Crawford DH. Allogeneic T-cell therapy for Epstein-Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease: long-term follow-up. *Transplantation*. (2010) 90:93–4. doi: 10.1097/TP.0b013e3181d7c424
140. Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, et al. Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol Ther*. (2011) 19:2258–68. doi: 10.1038/mt.2011.167
141. Avigan D, Rosenblatt J. Vaccine therapy in hematologic malignancies. *Blood*. (2018) 131:2640–50. doi: 10.1182/blood-2017-11-785873
142. Inaguma Y, Akahori Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, 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*. (2014) 21:575–84. doi: 10.1038/gt.2014.30
143. Oji Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Murakami Y, Iwai M, Kagawa N, et al. Association of WT1 IgG antibody against WT1 peptide with prolonged survival in glioblastoma multiforme patients vaccinated with WT1 peptide. *Int J Cancer*. (2016) 139:1391–401. doi: 10.1002/ijc.30182
144. Hess Michelini R, Freschi M, Manzo T, Jachetti E, Degl, Innocenti E, et al. Concomitant tumor and minor histocompatibility antigen-specific immunity initiate rejection and maintain remission from established spontaneous solid tumors. *Cancer Res*. (2010) 70:3505. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4253
145. Manzo T, Sturmheit T, Basso V, Petrozziello E, Hess Michelini R, Riba M, et al. T cells redirected to a minor histocompatibility antigen instruct intratumoral TNF $\alpha$  expression and empower adoptive cell therapy for solid tumors. *Cancer Res*. (2017) 77:658–71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN16-0725
146. Randolph SSB, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood*. (2004) 103:347–52. doi: 10.1182/blood-200307-2603

147. Guo M, Hu K-X, Liu G-X, Yu C-L, Qiao J-H, Sun Q-Y, et al. HLA mismatched stem-cell microtransplantation as postremission therapy for acute myeloid leukemia: long-term follow-up. *J Clin Oncol.* (2012) 30:4084–90. doi: 10.1200/JCO.2012.42.0281
148. Tyler EM, Koehne G. The emergence of WT1-specific T-cell responses following allogeneic T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation and low-dose donor lymphocyte infusions is associated with a graft-vs.-myeloma effect. *Oncoimmunology.* (2013) 2:e24963. doi: 10.4161/onci.24963
149. Gröger M, Gagelmann N, Wolschke C, von Pein U-M, Klyuchnikov E, Christopeit M, et al. Long-term results of prophylactic donor lymphocyte infusions for patients with multiple myeloma after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2018) 24:1399–405. doi:10.1016/j.bbmt.2018.04.018
150. Legrand F, Le Floch AC, Granata A, Fürst S, Faucher C, Lemarie C, et al. Prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation for high-risk AML. *Bone Marrow Transplant.* (2017) 52:620–1. doi: 10.1038/bmt.2016.326
151. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Lower M, Diekmann J, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature.* (2015) 520:692–6. doi: 10.1038/nature14426
152. McCurdy SR, Iglehart BS, Batista DA, Gocke CD, Ning Y, Knaus HA, et al. Loss of the mismatched human leukocyte antigen haplotype in two acute myelogenous leukemia relapses after haploidentical bone marrow transplantation with post-transplantation cyclophosphamide. *Leukemia.* (2016) 30:2102–6. doi: 10.1038/leu.2016.144
153. Lindblad KE, Goswami M, Hourigan CS, Oetjen KA. Immunological effects of hypomethylating agents. *Expert Rev Hematol.* (2017) 10:745–52. doi: 10.1080/17474086.2017.1346470
154. Gang AO, Frøsig TM, Brimnes MK, Lyngaa R, Treppendahl MB, Grønbæk K, et al. 5-Azacytidine treatment sensitizes tumor cells to T-cell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies. *Blood Cancer J.* (2014) 4:e197-e. doi: 10.1038/bcj.2014.14

155. Yu G, Wu Y, Wang W, Xu J, Lv X, Cao X, et al. Low-dose decitabine enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by re-modulating the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol.* (2019) 16:401–9. doi: 10.1038/s41423-018-0026-y
156. Dubovsky JA, McNeel DG, Powers JJ, Gordon J, Sotomayor EM, Pinilla-Ibarz JA. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with a hypomethylating agent induces expression of NXF2, an immunogenic cancer testis antigen. *Clin Cancer Res.* (2009) 15:3406. doi: 10.1158/1078-0432.CCR08-2099
157. Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell.* (2015) 162:974–86. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.011
158. Brocks D, Schmidt CR, Daskalakis M, Jang HS, Shah NM, Li D, et al. DNMT and HDAC inhibitors induce cryptic transcription start sites encoded in long terminal repeats. *Nat Genet.* (2017) 49:1052–60. doi: 10.1038/ng.3889
159. Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell.* (2015) 162:961–73. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.056

**Table 1 : MHC-associated antigens targeted in T-cell therapy trials for blood cancers.**

TABLE 1 | MHC-associated antigens targeted in T-cell therapy trials for blood cancers.

Target antigen	Unique or multiple antigen(s)	Antigen type	Natural vs. transgenic TCR	Cancer type	HLA restriction	References
HA-1	Unique antigen	MiHA	Natural	AML, CML, ALL	A0201	(100)
P2RX7 <sup>265-273</sup>	Unique antigen	MiHA	Natural	ALL	A2902	(101)
DPH1 <sup>334-343</sup>	Unique antigen	MiHA	Natural	MDS	B5701	(101)
DDX37	Unique antigen	MiHA	Natural	ALL	B2705	(101)
BCR-ABL fusion	Antigen library	TSA	Natural	ALL	ND	(75)
WT-1 <sup>126-134</sup>	Unique antigen	TAA	Natural/Transgenic	AML, ALL, MDS	A0201	(102, 103)
WT-1 <sup>235-243</sup>	Unique antigen	TAA	Transgenic	AML, MDS	A2402	(104)
MAGE-A3	Unique antigen	TAA	Transgenic	MM	A01	(105)
NY-ESO-1/LAGE-1	Unique antigen	TAA	Transgenic	MM	A0201	(106)
LMP1, LMP2	Antigen library	Viral Ag	Natural	Lymphoma	ND	(107)

ALL, Acute lymphoblastic leukemia; AML, Acute myeloid leukemia; CML, Chronic myelogenous leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; MM, Multiple myeloma. ND, not defined.

## Figures Legends

**Figure 1 : Target MHC-associated antigens in hematological cancers.** Major histocompatibility complex (MHC)-associated antigens may originate from viral components, such as the episomal translation of Epstein-Barr Virus proteins (purple). The majority of known minor histocompatibility antigens (MiHA) are generated by non-synonymous single nucleotide polymorphisms (ns-SNP) between the donor and the recipient of the T-cell therapy (red). Tumor-specific antigens (TSA) arise from intronic or exonic mutations unique to the tumor cells (orange). Tumor-associated antigens (TAA) come from aberrantly expressed proteins in cancer cells (green).

**Figure 2 : Ideal MiHA target selection.** Important criteria and proposed algorithm to select optimal target MiHA for immunotherapy of blood cancers.

**Figure 3 : Clinical integration of T-cell therapies targeting MHC-associated antigens.** Representation of T-cell therapy timing relative to disease history. While early treatment or treatment following a reduction in disease burden may be associated with prolonged remission (dotted red lines), late-stage blood cancers treatment with MHC-associated antigen-specific T cells may only delay disease progression.

Figure 1

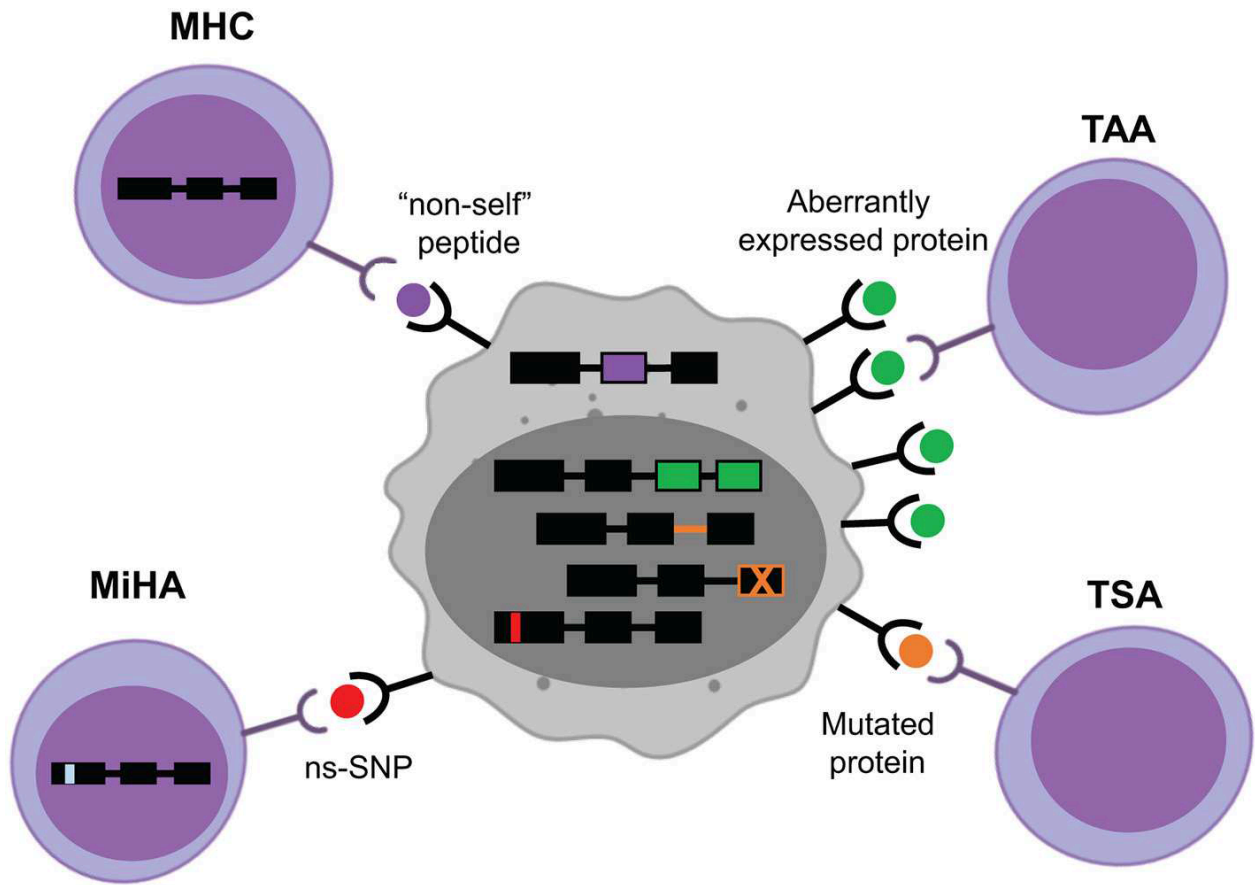


Figure 2

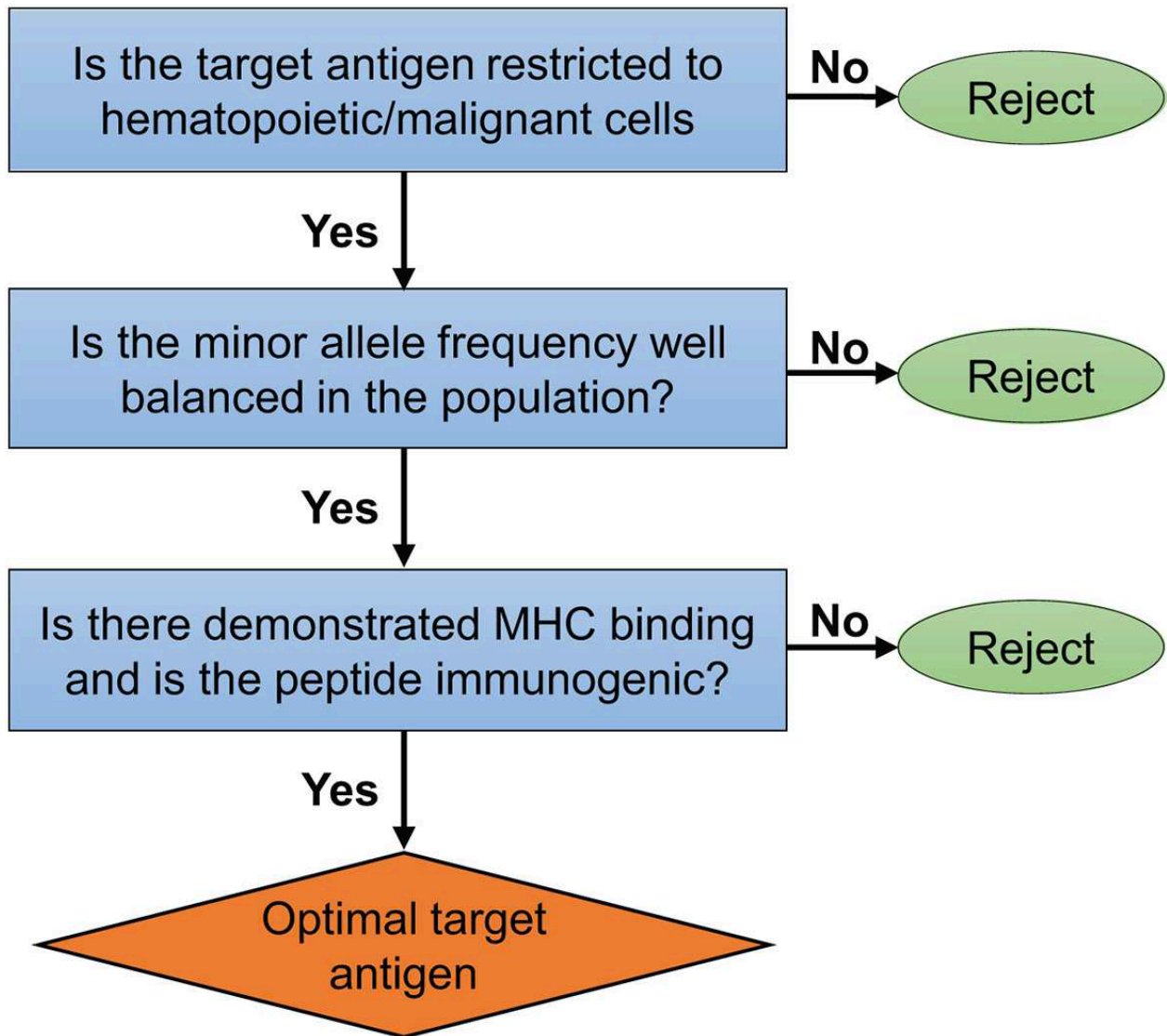
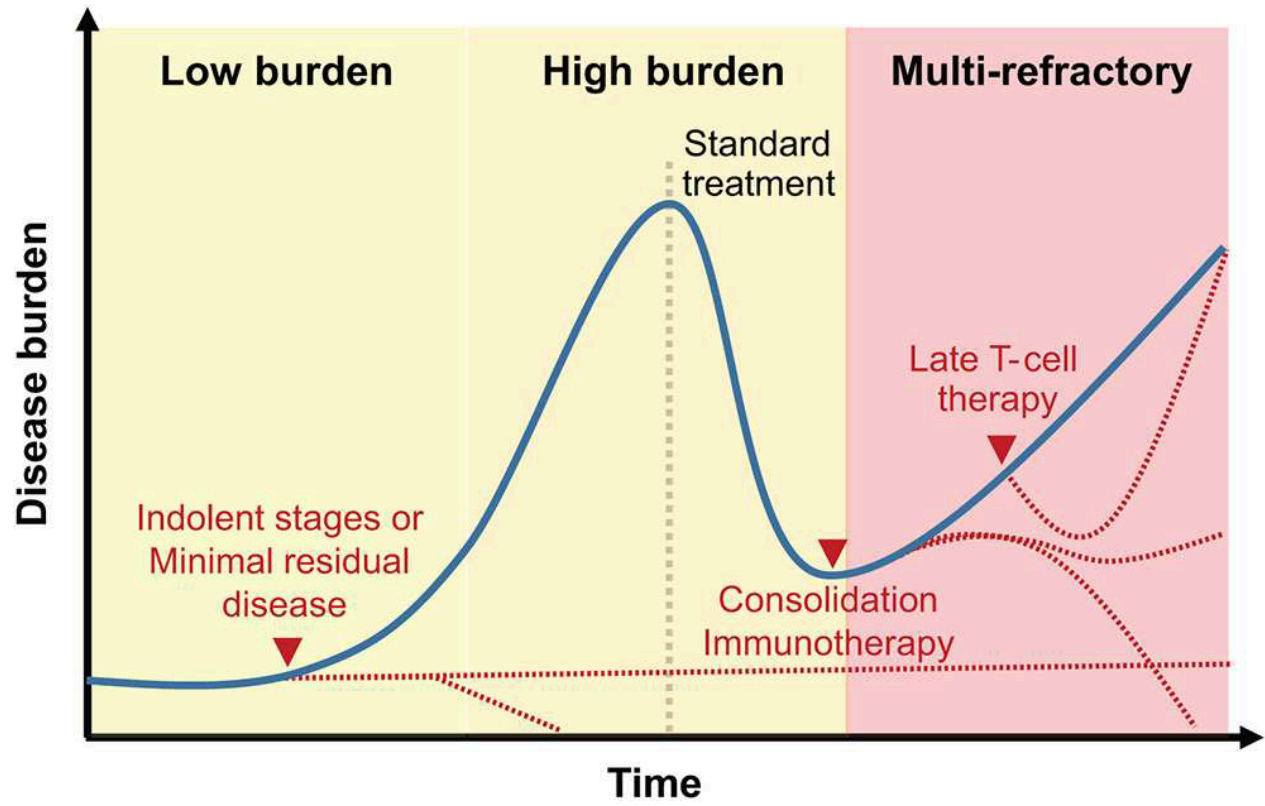




Figure 3



## **5 Hypothèse et objectifs**

### **5.1 Hypothèse**

Les cancers du sang, telles les leucémies, sont des maladies pour lesquelles de récentes avancées ont vu le jour. Cependant, peu de traitements amènent une rémission durable et complète (84). Il existe donc un besoin médical pour développer de nouvelles thérapies qui pourraient cibler un plus grand nombre de patients et éliminer les cellules tumorales. La tumorigénèse se met en place suite à la défaillance du système immunitaire pour éliminer ces cellules étrangères (85). Des approches d'immunothérapie ont donc été développées pour répondre à cette problématique. En effet, l'immunothérapie offre la possibilité d'augmenter la reconnaissance des cellules cancéreuses et de les éliminer (86). Plusieurs types d'Ag tumoraux sont utilisés dans cette approche, tels les TAA, les MiHA et les TSA (62). Ces derniers (TSA) offrent l'avantage d'être présent uniquement sur les cellules cancéreuses et ne se retrouvent pas sur les cellules saines, mais de nombreuses questions demeurent sur leur utilisation. Leur application thérapeutique pourra se faire si ces aeTSA démontrent un bon potentiel immunogène, un fort niveau d'expression et une fréquence importante de cellules T réactives à ces Ag. L'hypothèse de travail est que les aeTSA immunodominants sont reconnus par un répertoire varié et abondant de cellules T retrouvées dans le sang périphérique de donneurs sains.

### **5.2 Objectifs**

- 1) Déterminer si les aeTSA stimulent une réponse immunitaire chez l'humain.
- 2) Définir la taille et la diversité du répertoire TCR anti-aeTSA des lymphocytes T à partir du sang périphérique de donneurs sains afin de déterminer les clonotypes les plus pertinents pour une utilisation en immunothérapie.

## **Matériel et méthodes**

## **6 Matériel et méthodes**

### **6.1 Isolation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs)**

Les échantillons proviennent de donneurs sains exprimant les HLA A0201, A1101, B0702 ou B0801, préalablement déterminés par génotypage haute résolution. Les PBMCs ont été obtenues par dons de plaquettes par aphérèse ou par ponction veineuse après consentement éclairé des volontaires. Les chambres de leucoréduction (LRSC) récoltées ont été conservées à température pièce (entre 20 et 24°C) jusqu'à isolation des cellules, pour un maximum de 24h après l'aphérèse. Les leucocytes ont été récupérés avec 40 mL de tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; ThermoFisher, Waltham, MA) contenant 10% d'anticoagulant Citrate-Dextrose (ACD ; Fenwal, C4B7898Q), puis isolés par gradient de séparation selon les instructions du manufacturier (Stemcell Technologies, Lymphoprep™, Vancouver, B.C., Canada). Les cellules ont par la suite été utilisées fraîches ou cryopréservées à -80°C pendant 18h, puis transférées dans un réservoir d'azote liquide dans un milieu contenant 90% de sérum fœtal bovin (FBS; ThermoFisher) et 10% de Diméthylsulfoxyde (DMSO).

### **6.2 Protocole d'expansion rapide (REP)**

Les cellules PBMCs ont été triées pour le dextramère d'intérêt et les cellules positives à celui-ci ont été mises en culture pour 12 jours dans une flasque cellulaire T25. Les cellules ont été resuspendues dans 25 mL de milieu de culture CTL (Advanced RPMI 1640, 10% human serum, 1X L-glutamine) contenant  $25 \times 10^6$  cellules PBMCs autologues irradiées (40 Gy), 30 ng/mL d'OKT3 et 50 IU/mL d'IL-2. Le milieu de culture et les cytokines ont été changés aux jours 4 et 8 puis les cellules ont été récoltées au jour 12 afin de réaliser un deuxième tri cellulaire.

### **6.3 Génération des cellules dendritiques (CD)**

Les monocytes ont été isolés des PBMCs par adhésion à la surface plastique d'une plaque 6 puits et ont été mis en culture pendant 9 jours dans du milieu de culture DC Media (X-vivo 15, 5% human serum, 1X L-glutamine et 1 mM sodium pyruvate) supplémenté avec 1000 U/mL d'IL-4

(Miltenyi Biotec, San Diego, CA) et 800 U/mL de GM-CSF (Miltenyi Biotec). Le milieu de culture et les cytokines ont été changés au jour 3 et la maturation des CD a été effectuée au jour 7 avec 1ug/mL de LPS (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), 1ug/mL de PGE2 (Sigma-Aldrich) et 2ug/mL de peptide d'intérêt (JPT peptides). Au jour 8, 1000 U/mL d'IFN $\gamma$  (Miltenyi Biotec) a été ajouté pour le dernier 24h de maturation. Un total de  $0,5 \times 10^6$  CD ont été marquées à 4°C au jour 9 avec des anticorps monoclonaux pour : CD11c, CD80, CD86, HLA-ABC (BD Biosciences, Mississauga, ON), CD14 (BioLegend, San Diego, CA), CD83 et HLA-DR (eBiosciences, San Diego, CA). Les cellules ont été lavées et fixées dans du PBS 2% FBS 1% paraformaldéhyde (PFA) avant l'acquisition au cytomètre LSRII (BD Biosciences). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo™ V10 Software (BD Biosciences).

## **6.4 Génération des lignées de lymphocytes T**

Les lignées cellulaires ont été générées en utilisant  $10 \times 10^6$  de PBMCs et  $5 \times 10^6$  de cellules T CD8+ naïves enrichies selon les instructions du manufacturier (EasySep #19258, StemCell Technologies). Les cellules ont été mises en co-culture à un ratio 1 :10 (stimulateur : effecteur) avec des CD autologues matures présentant le peptide d'intérêt. Après une irradiation de 40 Gy, les CD ont été « pulsées » (exposées brièvement à de très fortes concentrations de peptides) avec les peptides d'intérêt. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu de culture CTL supplémenté avec 10 ng/ml d'IL-12 et 10 ng/ml d'IL-21 dans une plaque de puits G-Rex 6 (Wilson Wolf, New Brighton, MN) et incubées à 37°C et 5% CO $_2$  pour 7 jours. Au jour 7, les cellules T ont été lavées et restimulées avec des CD chargées avec le peptide d'intérêt puis remises en culture dans du milieu CTL supplémenté avec 100 U/ml d'IL-2, 30 ng/ml d'IL-21, 10 ng/ml d'IL-7 et 5 ng/ml d'IL-15. Les cellules T ont été restimulées de la même façon au jour 14 et le milieu de culture et les cytokines ont été changés aux jours 11 et 18. La concentration cellulaire a été ajustée à  $0,5 \times 10^6$  cellules/ml chaque semaine. Les cellules ont été comptées par exclusion au bleu de trypan avec un compteur de cellules automatiques (Countness, Invitrogen).

## **6.5 Analyses phénotypiques par cytométrie de flux**

Le phénotype des cellules T a été évalué aux jours 7, 14 et 21 de la culture. Un total de  $1,0 \times 10^6$  de cellules ont été marquées à 4°C avec des anticorps monoclonaux pour : CD3, CD4, CD45RO, CD45RA, CCR7 (BD Biosciences), CD62L (BioLegend) et CD8 (eBiosciences). Afin de déterminer la spécificité antigénique, des marquages avec les dextramères (Immudex, Copenhague, Danemark) d'intérêts ont également été réalisés aux jours 14 et 21. Les cellules ont été lavées et fixées dans du PBS 2% FBS 1% PFA avant l'acquisition au cytomètre LSRII (BD Biosciences). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo™ V10 Software (BD Biosciences).

## **6.6 Test de réactivité IFN $\gamma$ enzyme-linked immunospot assay (ELISpot)**

La réactivité spécifique des lignées de cellules T générées a été évaluée en quantifiant le nombre de cellules T produisant de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une restimulation avec l'Ag d'intérêt. Après 21 jours de culture,  $1,0 \times 10^5$  cellules ont été restimulées soit avec 100 ug/ml de peptide d'intérêt, d'un peptide témoin (contrôle négatif), ou en les stimulant avec un anticorps anti-CD3 (contrôle positif), pendant 18h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. La révélation a été effectuée selon les instructions du fabricant (Mabtech Inc., Cincinnati, OH). L'analyse a été réalisée sur un spectre de lecture vSpot (AID, Strassberg, Allemagne).

## **6.7 Marquage intracellulaire**

Pour évaluer la fonctionnalité spécifique des lignées de cellules T générées, au jour 21 de culture,  $1,0 \times 10^6$  de cellules ont été incubées en présence de 7,5 ug/ml de Brefaldine A (Sigma-Aldrich) avec 5 ug/ml du peptide d'intérêt, 5 ug/ml d'un peptide témoin (contrôle négatif) ou 50 ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et 500 ng/ml d'ionomycin (contrôle positif, Sigma-Aldrich) pour 4h. Les cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps de surface cellulaire puis fixées et perméabilisées en utilisant le tampon Cytofix/Cytoperm pour marquage intracellulaire selon les instructions du fabricant (BD Biosciences). Les cellules perméabilisées ont été incubées avec l'IFN $\gamma$ , l'IL-2 et le TNF $\alpha$  (BD Biosciences) pendant 20 minutes à 4°C. L'acquisition

a été réalisée au cytomètre LSRII (BD Biosciences) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo™ V10 Software (BD Biosciences).

## **6.8 Tri cellulaire**

Les cellules positives pour le dextramère d'intérêt ont été sélectionnées et isolées par tri cellulaire. Après 21 jours de culture, les cellules ont été marquées 45 minutes à 4°C avec les dextramères (Immudex) d'intérêts puis 30 minutes à 4°C avec l'anticorps monoclonal CD8 (eBiosciences). L'acquisition a été réalisée avec le FACS Aria III sorter (BD Biosciences) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo™ V10 Software (BD Biosciences).

## **6.9 Séquençage**

Le séquençage du TCR a été réalisé sur des cellules après 21 jours en co-culture et triées à l'aide de dextramères. Les échantillons avaient entre  $2-16 \times 10^6$  cellules. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) TCR $\beta$ -spécifique a été utilisé pour définir les répertoires des cellules T. L'ARN a été extrait par Trizol en association avec le système de mini-colonnes et de micro-colonnes PureLink RNA (ThermoFisher Scientific), quantifié par spectrophotométrie UV (Tecan), et QC a été réalisé sur puce Bioanalyzer (Agilent). Les bibliothèques d'amplicons TCR $\beta$  ont été préparées à partir de 25 ng d'ARN total avec le test Oncomine™ TCR Beta-SR pour l'ARN (ThermoFisher Scientific). Les bibliothèques TCR $\beta$  obtenues ont été quantifiées sur le système de PCR en temps réel ViiA 7 avec le kit de quantification Ion Library Taqman (ThermoFisher Scientific). Le NGS a été réalisé sur la plate-forme de semi-conducteurs Ion S5 (ThermoFisher Scientific) à l'aide d'une puce Ion 540 (ThermoFisher Scientific), préparée avec le système Ion Chef (ThermoFisher Scientific). L'analyse du répertoire TCR $\beta$  a été réalisée avec le logiciel Ion Reporter (ThermoFisher Scientific).

## **6.10 Analyses statistiques**

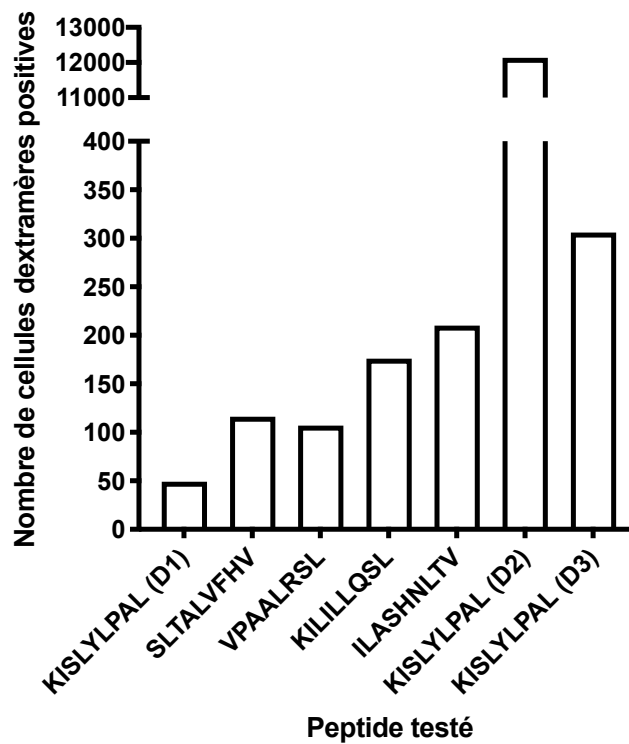
Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism version 8.0 en utilisant l'ANOVA bidirectionnelle. Les valeurs de P plus petites que 0,05 ont été considérées comme significatives.

## **7 Résultats**



## 7.1 Identification des cellules dextramères positives à partir du sang périphérique de donneurs sains

Afin de déterminer la fréquence des cellules T anti-aeTSA dans le sang périphérique, les PBMCs de donneurs sains ayant le HLA d'intérêt ont été enrichies en CD8<sup>+</sup> puis directement triées avec le dextramère d'intérêt. Un dextramère consiste en un squelette de dextran sur lequel est attaché un certain nombre de molécules du CMH ainsi que des fluorochromes, qui permet par cytométrie de flux, la détection des lymphocytes T spécifiques à l'Ag (87). Un dextramère pour des peptides témoins a été utilisé comme contrôle négatif. Un total de 5 différents peptides ont été testés dont un (KISLYLPAL) a été testé avec trois différents donneurs (D1, D2 et D3). Le nombre de cellules positives pour le dextramère d'intérêt varie entre 49 et 12 131 (Figure 2), alors que le nombre de PBMCs utilisées au départ varie entre 102x10<sup>6</sup> et 500x10<sup>6</sup> dont l'enrichissement en cellules CD8<sup>+</sup> a fourni entre 9x10<sup>6</sup> et 27x10<sup>6</sup> cellules. Ces résultats montrent que le nombre des cellules T aeTSA spécifiques dans l'échantillon de sang est trop faible pour une analyse ultérieure.

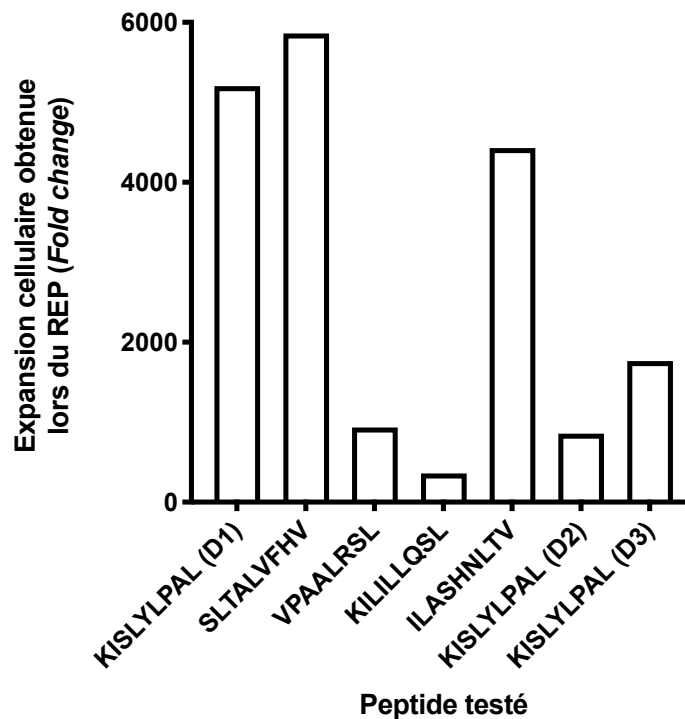


**Figure 2. – Cellules dextramères positives retrouvées dans le sang périphérique de donneurs sains.**

Nombre de cellules positives au marquage avec le dextramère d'intérêt analysé en cytométrie de flux,  $n = 1$ . D1, donneur 1 ; D2, donneur 2 ; D3, donneur 3.

## 7.2 Expansion des cellules dextramères positives par un protocole d'expansion rapide (REP)

Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour effectuer un séquençage du TCR $\beta$ , l'expansion des cellules CD8<sup>+</sup> positives aux dextramères a été réalisée à l'aide d'un REP précédemment établi au laboratoire (88). La stimulation polyclonale des cellules T est effectuée à l'aide d'anticorps anti-CD3 et d'IL-2. L'expansion cellulaire varie entre 360 et 5862 fois le nombre de cellules détectées au premier tri (Figure 3).

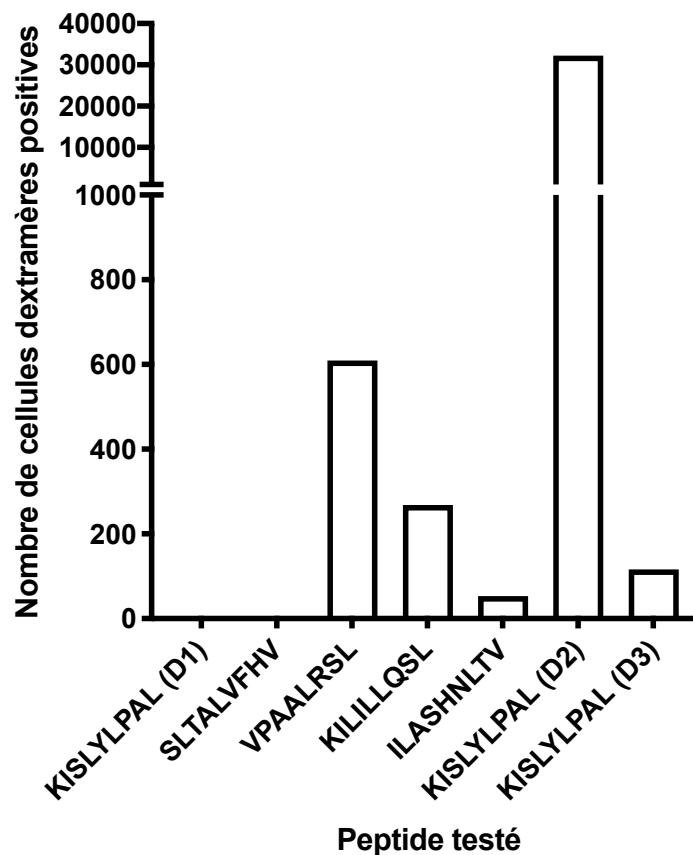


**Figure 3. – Expansion des cellules dextramères positives.**

Expansion des cellules triées pour le dextramère d'intérêt par rapport au jour 0 du protocole d'expansion rapide,  $n = 1$ . L'expansion cellulaire montre la croissance relative par rapport au nombre initial de cellules, basée sur les comptes cellulaires effectués au début et à la fin du REP. D1, donneur 1 ; D2, donneur 2 ; D3, donneur 3.

### 7.3 Identification des cellules dextramères positives après leur expansion

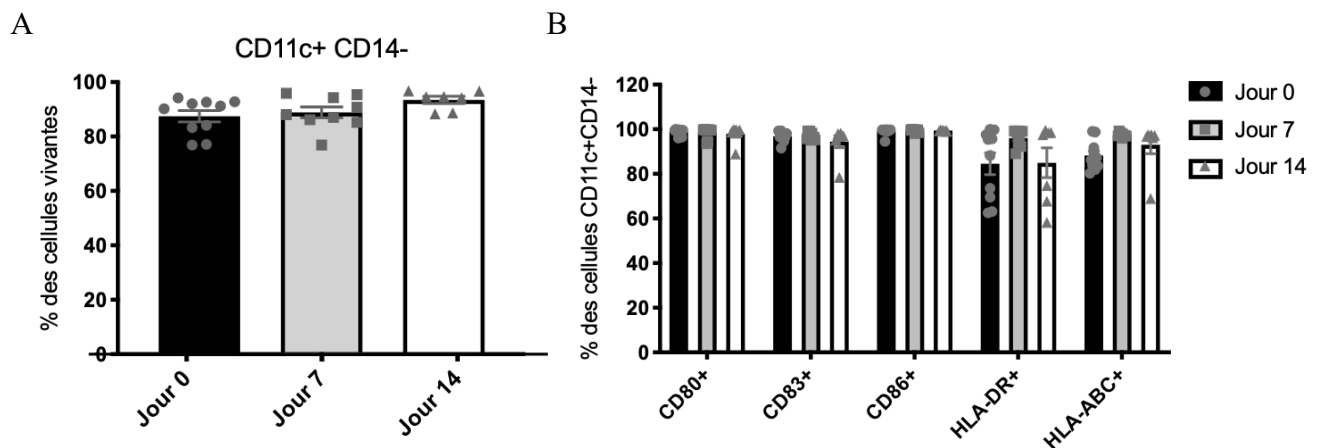
Un deuxième tri cellulaire est effectué après l'expansion des cellules afin de confirmer l'expansion des cellules positives aux dextramères. Un dextramère pour des peptides témoins a également été utilisé comme contrôle négatif. Le nombre de cellules marquées positives varie entre 0 et 32 243 (Figure 4), alors que ce nombre variait entre 49 et 12 131 lors du tri initial (figure 2), soit en moyenne pour le premier tri 0,017% des cellules CD8<sup>+</sup> obtenues et 0,018% pour le deuxième tri. Ces données montrent que les cellules T anti-aeTSA sont obtenues en nombre insuffisant pour poursuivre l'analyse et effectuer leur séquençage.



**Figure 4. – Cellules dextramères positives après sélection et expansion cellulaire.** Nombre de cellules positives au marquage avec le dextramère d'intérêt analysé en cytométrie de flux,  $n = 1$ . D1, donneur 1 ; D2, donneur 2 ; D3, donneur 3.

## 7.4 La méthode de co-culture requiert l'utilisation de cellules dendritiques matures

Afin d'obtenir un plus grand nombre de cellules T anti-aeTSA, une nouvelle approche de stimulation *ex vivo* à l'aide de CD autologues chargées avec le peptide d'intérêt a été utilisée, telle que déjà réalisée au laboratoire (88). Cette technique de co-culture de 21 jours, visant à stimuler un répertoire naïf, requiert des stimulations répétées (aux jours 0, 7 et 14 de la culture) avec les CD dont la maturation est réalisée au préalable. Le phénotype des CD est évalué avant chaque stimulation pour confirmer le type cellulaire à l'aide des anticorps CD11c et CD14 ainsi que la maturation à l'aide des marqueurs de surface CD80, CD83, CD86, HLA-DR et HLA-ABC. Les cellules obtenues sont composées en moyenne à plus de 87% de CD (CD11c<sup>+</sup> et CD14<sup>-</sup>) à chacun des temps étudiés (Figure 5A). De plus, les CD expriment à plus de 85% chacun des marqueurs de maturation, et ce pour chaque stimulation (Figure 5B). L'analyse des marqueurs est comparée aux mêmes cellules non marquées par les anticorps. Ces résultats confirment que les cellules utilisées pour stimulation dans la co-culture sont des CD matures.

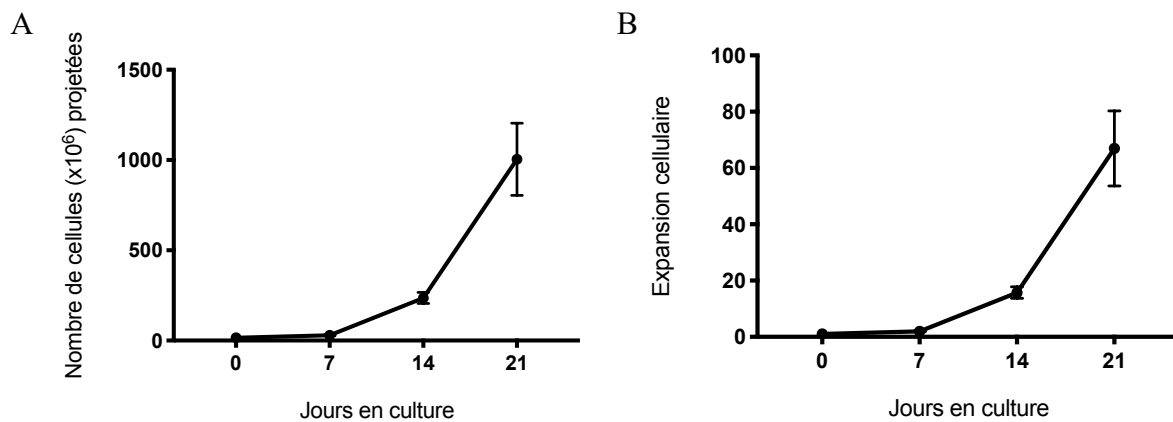


**Figure 5. – Caractérisation des CD requises pour la co-culture.**

Les CD ont été générées à partir des PBMCs des donneurs, tel que décrit à la page 83 (voir matériel et méthodes). A, Pourcentage (points de données pour chaque peptide et moyenne représentée par des histogrammes  $\pm$  SEM) des CD parmi les cellules vivantes, tel que défini par l'expression des marqueurs CD11c et CD14. B, Pourcentage (points de données pour chaque peptide et moyenne représentée par des histogrammes  $\pm$  SEM) d'expression des marqueurs de maturation (CD80, CD83, CD86, HLA-DR et HLA-ABC) sur les CD(CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>) ;  $n = 10$ .

## 7.5 Des cellules T CD8<sup>+</sup> peuvent être générées en grand nombre en co-culture

Les cellules T enrichies en CD8<sup>+</sup> naïves sont mises en culture dans un bioréacteur G-rax avec des PBMCs du même donneur et les CD matures. L'enrichissement en CD8<sup>+</sup> naïves permet d'augmenter le nombre de précurseurs potentiels ciblant les Ag investigués, alors que l'utilisation de PBMCs permet d'inclure des cellules CD4<sup>+</sup> qui aident à l'activité des CD8<sup>+</sup> (89). En 21 jours, plus de 1000x10<sup>6</sup> cellules sont en moyenne obtenues (Figure 6A), soit une expansion moyenne de 67 fois le nombre de départ (Figure 6B). Ces données montrent qu'il est possible d'obtenir des cellules en très grand nombre par la méthode de co-culture.

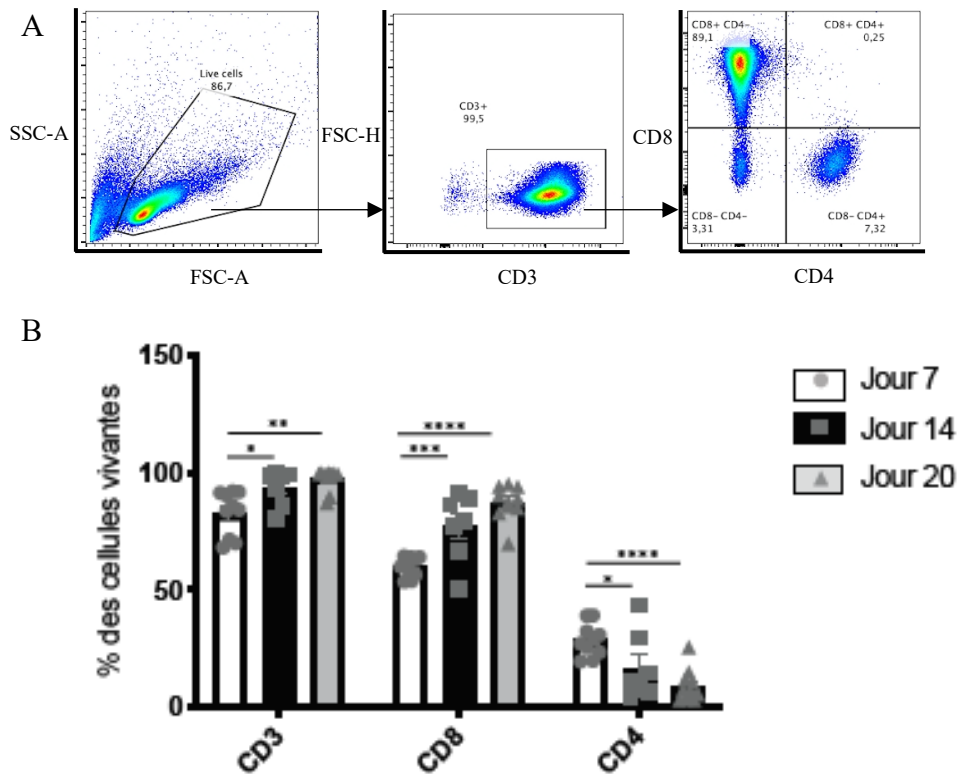


**Figure 6. – Expansion cellulaire en co-culture.**

A, Nombre absolu des cellules projetées. La concentration cellulaire étant ajustée à 0,5x10<sup>6</sup> cellules/ml chaque semaine et le restant étant écarté, un calcul du nombre de cellules projetées par rapport au nombre de cellules obtenues est effectué. B, Expansion moyenne des cellules par rapport au jour 0 de la culture.  $n = 10$ , les données montrent la moyenne des cultures  $\pm$  SEM.

## 7.6 Des cellules de phénotype majoritairement CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> sont obtenues suite à la co-culture

Afin de caractériser les cellules T générées, des marquages phénotypiques ont été réalisés aux jours 7, 14 et 21 de la co-culture dans laquelle des cytokines exogènes sont ajoutées à différents stades pour favoriser la différenciation et l'expansion des cellules T. Au jour 7 de la co-culture, 83% des cellules sont CD3<sup>+</sup> dont 29% sont CD4<sup>+</sup> et 60% sont CD8<sup>+</sup> (Figure 7). La progression de la co-culture amène une augmentation du pourcentage de cellules CD8<sup>+</sup> aux dépens des cellules CD4<sup>+</sup> et au jour 21, les lignées T comportent en moyenne 97% de CD3<sup>+</sup> dont 87% sont CD8<sup>+</sup>. Ces données montrent que les lignées de cellules T obtenues sont composées majoritairement de CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> après 21 jours.

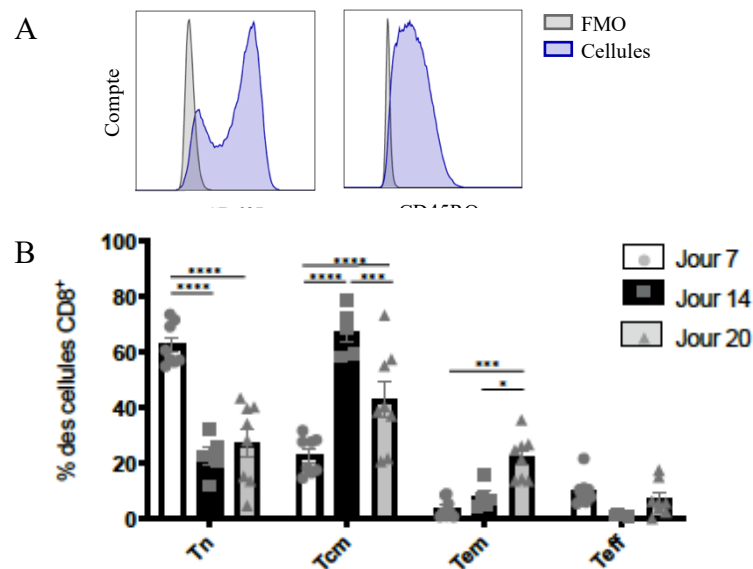


**Figure 7. – Caractérisation du phénotype des lignées cellulaires T.**

A, Sélection représentative de la population cible. B, Pourcentage (points de données pour chaque peptide et moyenne représentée par des histogrammes  $\pm$  SEM) de cellules T CD3<sup>+</sup> et leur distribution en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>.  $n = 10$ . \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,005$ , \*\*\*,  $P < 0,0005$ , \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .

## 7.7 Des cellules au stade de différenciation Tcm et Tem sont principalement obtenues après trois semaines de culture

Dans le but d'évaluer la différenciation des lymphocytes T obtenus, l'expression des marqueurs de surface CD45RO et CD62L a été évaluée (Figure 8). La différenciation de la cellule T, dictée par la force du signal d'activation, comporte trois stades allant de lymphocytes non différenciés Tn, à Tm, à Teff. Au jour 7, la majorité (63%) des cellules T CD8<sup>+</sup> sont des cellules naïves alors qu'au jour 14, ce nombre diminue grandement (23%) et les cellules retrouvées sont principalement des cellules mémoires, avec une prédominance de Tcm (68%). Au jour 21 de la co-culture, le type de cellules prédominantes retrouvées est des cellules mémoires (43% Tcm et 22% Tem) avec présence de cellules naïves (28%) et de cellules effectrices (7%). Il faut noter que les résultats d'une culture stimulée à l'aide de deux peptides différents ont été exclus de l'analyse, car le marquage avec les anticorps a échoué. Ces résultats indiquent que les lignées issues de la co-culture comportent un mélange de cellules T différenciées.

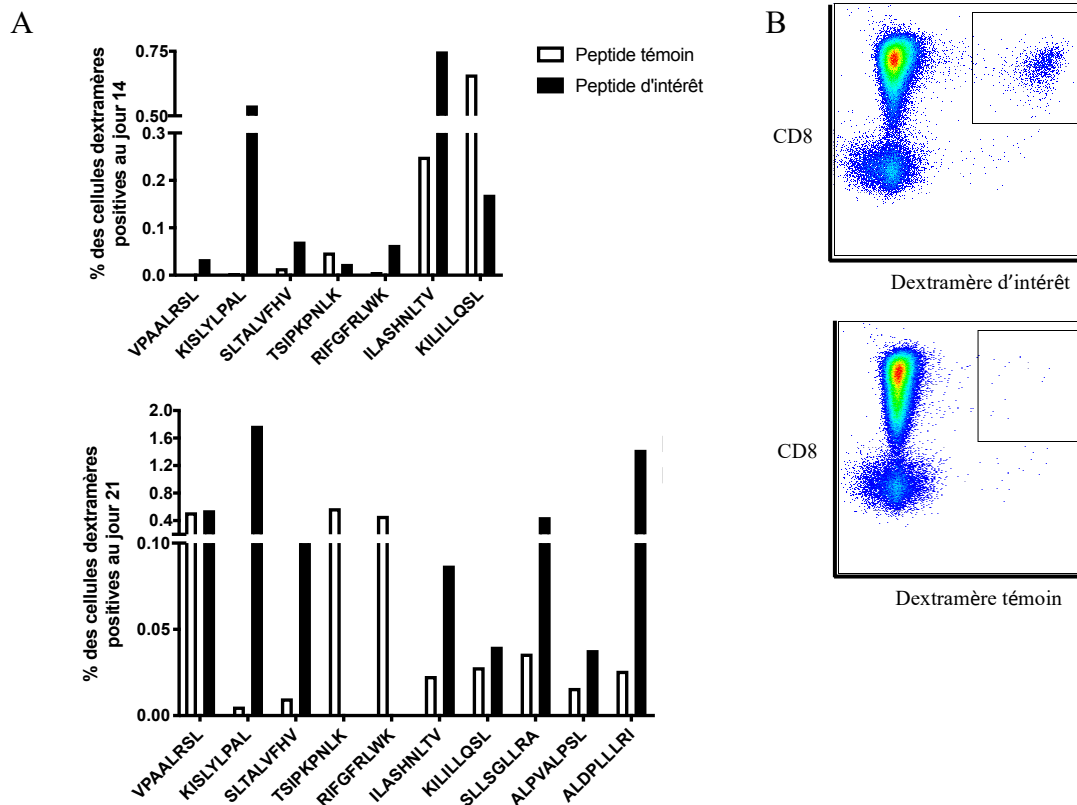


**Figure 8. – Caractérisation de la différenciation des lignées cellulaires T.**

A, Sélection représentative de la population cible. Pourcentage (points de données pour chaque peptide et moyenne représentée par des histogrammes  $\pm$  SEM) des sous-populations de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> selon leur profil de différenciation, tel que défini par CD45RO et CD62L. FMO fait référence à la fluorescence moins un. Tn, CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>; Tcm, CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>; Tem, CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>; Teff, CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>;  $n = 8$ . \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,005$ , \*\*\*,  $P < 0,0005$ , \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .

## 7.8 Des cellules T réactives à des TSA sont obtenues après co-culture

Utilisant la méthode de co-culture, nous avons testé 10 aeTSA provenant de tumeurs leucémiques humaines (68). Dans le but d'étudier le caractère immunogène des peptides testés, un marquage des cellules avec les dextramères d'intérêt a été réalisé. Parmi les peptides testés, 50% (KISLYLPAL, SLTALVFHV, ILASHNLTV, SLLSGLLRA et ALDPLLLRI) ont pu stimuler une réponse CD8 démontrable avec le marquage avec dextramère d'intérêt au jour 21 (Figure 9B), dont 3 (KISLYLPAL, SLTALVFHV et ILASHNLTV) pour lesquels la réponse est observée dès le jour 14 (Figure 9A). La proportion des cellules dextramères positives varie entre les différents peptides et atteint 1,78% pour 1 peptide (KISLILPAL). Trois peptides supplémentaires sont montrés au jour 21 par rapport au jour 14 dû à la fermeture des laboratoires au début de la pandémie Covid-19 et qui a empêché l'analyse de ces trois peptides au jour 14. Ces résultats montrent qu'il est possible de générer des cellules T aeTSA spécifiques détectables par cytométrie en flux.



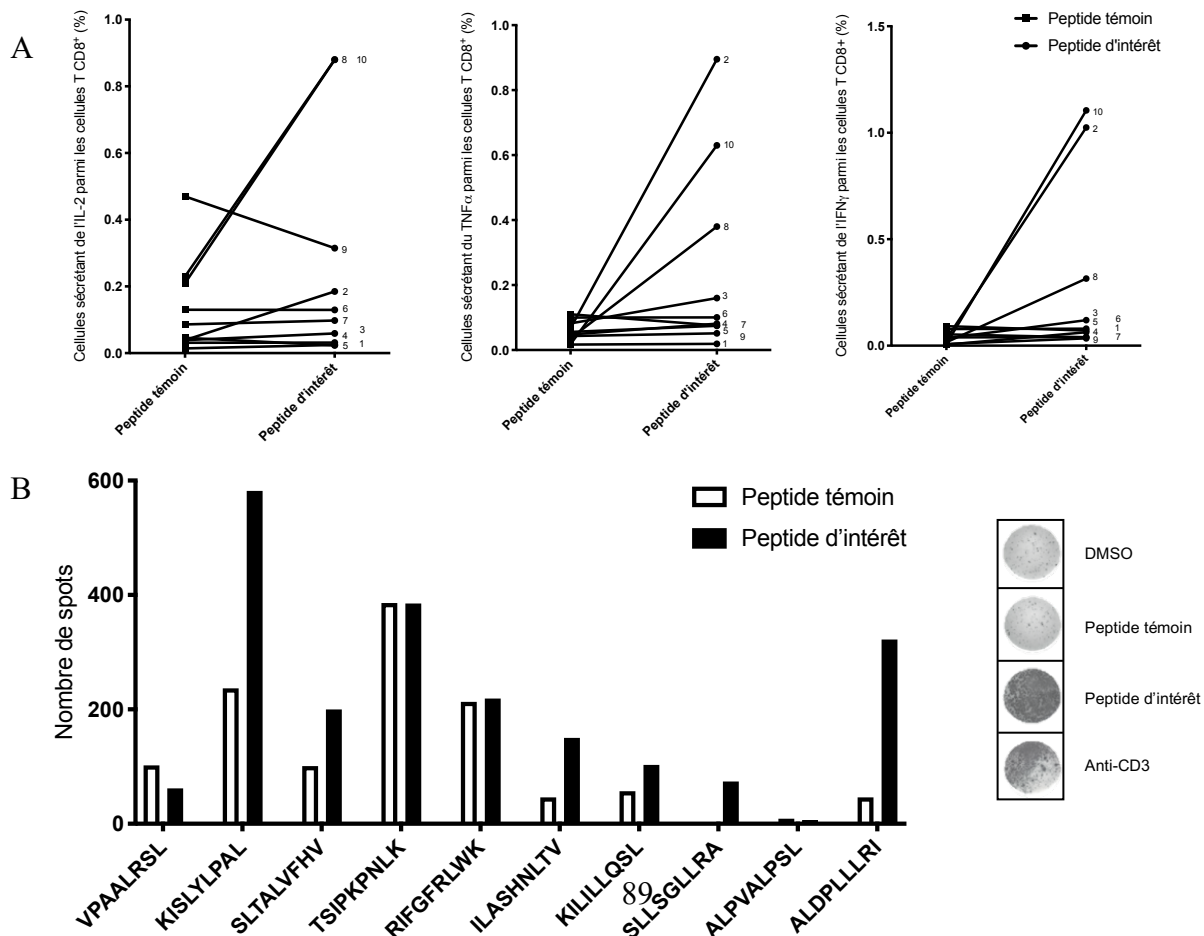
**Figure 9. – Génération de lignées de cellules T TSA spécifiques en co-culture.**

A, Pourcentage des cellules positives au marquage avec le dextramère d'intérêt analysé en cytométrie de flux aux jours 14 (en haut) et 21 de la culture (en bas). B, Sélection représentative.  $n = 1$ .



## 7.9 L'immunogénicité des aeTSA est confirmée par des tests fonctionnels

Afin de confirmer de façon fonctionnelle la réactivité des cellules aeTSA spécifiques, la sécrétion des cytokines intracellulaires IL-2, TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$  a été évaluée (Figure 10A). Les cellules réactives aux peptides KISLYLPAL, SLLSGLLRA et ALDPLLLRI montrent une nette augmentation de la sécrétion de cytokines par rapport aux peptides témoins, de même que les cellules réactives au peptide SLTALVFHV dont l'augmentation est plus modeste. Le test d'ELISpot, qui identifie la production d'IFN $\gamma$  des LT après leur réexposition à leur Ag spécifique, a également été utilisé comme test fonctionnel (Figure 10B). La réactivité des 5 peptides précédemment identifiés comme immunogènes par le marquage au dextramère a été confirmée par ce test. Des contrôles sont également inclus dans les tests fonctionnels, soit un contrôle positif en utilisant l'anticorps anti-CD3 et un contrôle négatif en utilisant le diluant peptidique DMSO (données non montrées). Ces contrôles permettent d'établir le bruit de fond non spécifique. Ces données confirment le potentiel immunogène de ces aeTSA.



**Figure 10. – Évaluation de la fonctionnalité des lignées de cellules T TSA spécifiques en co-culture.**

A, Pourcentage des cellules CD8<sup>+</sup> produisant les cytokines IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  et IL-2, soumises à une coloration intracellulaire pour analyse en cytométrie de flux au jour 21 ;  $n = 1$ . (1)VPAALRSL ; (2)KISLYLPAL ; (3)SLTALVFHV ; (4)TSIPKPNLK ; (5)RIFGFRLWK ; (6)ILASHNLTV ; (7)KILILLQSL ; (8)SLLSGLLRA ; (9)ALPVALPSL ; (10)ALDPLLLRI. B, Résultats compilés (à gauche) et un résultat représentatif (à droite) d'ELISpot à 21 jours de culture montrant des cellules T sécrétant de l'IFN $\gamma$ , sans stimulation (cellules exposées au diluant peptidique seulement ; DMSO), avec stimulation avec un peptide non ciblé (peptide témoin), avec le peptide d'intérêt ou avec l'agoniste anti-CD3 (témoin positif) ;  $n = 1$ .

## **7.10 Le répertoire TCR $\beta$ des cellules T réactives aux aeTSA est oligoclonal et peu abondant**

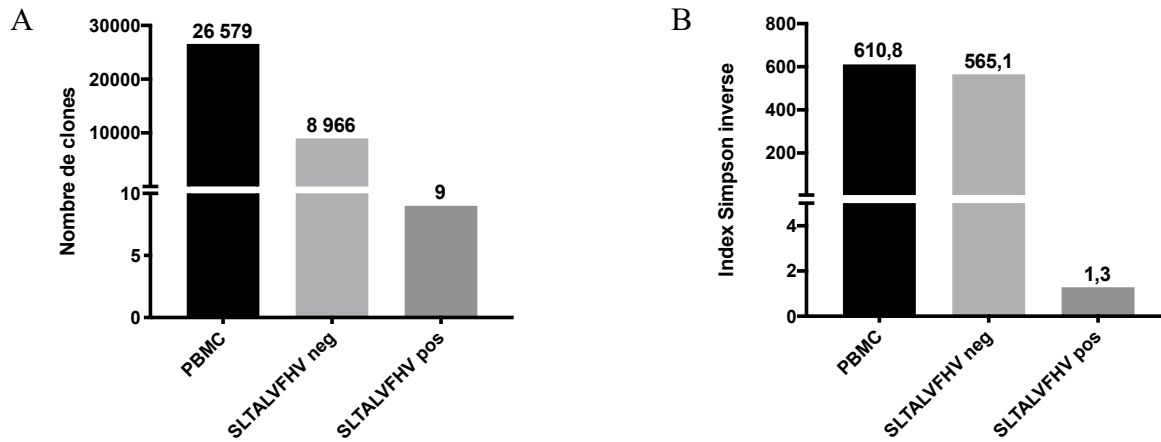
Afin de déterminer la taille et la diversité du répertoire TCR des lymphocytes T anti-aeTSA, les cellules positives pour le dextramère d'intérêt ont été triées et le séquençage des régions CDR3 des TCR $\beta$  de ces lymphocytes T a été effectué. En effet, étant donné que la chaîne  $\alpha$  du TCR est recombinée après la chaîne  $\beta$  de celui-ci et qu'elle est moins diversifiée, l'utilisation du séquençage des TCR $\beta$  est grandement utilisée comme mesure de la diversité du répertoire TCR. De plus, la région jonctionnelle CDR3 du TCR est unique à chaque cellule T nouvellement formée et est responsable de la majorité de la diversité. Lorsqu'une cellule T est activée et subit une expansion clonale, toutes les cellules de cette lignée clonale auront un CDR3 identique, agissant ainsi comme identifiant de la clonalité des lymphocytes (90). Ainsi, les séquences nucléotidiques des CDR3 des TCR $\beta$  uniques sont susceptibles de correspondre à des clones distincts et sont donc les régions utilisées pour le séquençage (91). Dû aux délais engendrés par la pandémie Covid-19 et la fermeture temporaire des laboratoires, les cellules réactives à un seul aeTSA ont pu être séquencées, alors que le reste d'entre elles sont en attente de procédure. Le nombre de séquences nucléotidiques uniques (clonotype) et la diversité de celles-ci ont été évalués pour les cellules marquées par le dextramère d'intérêt SLTALVFHV, pour les cellules dextramère négatives, ainsi que pour les PBMCs du donneur afin d'évaluer la fréquence des clones spécifiques à l'Ag dans le répertoire circulant pré-expansion (Figure 11A, B). Le séquençage montre que seulement 9 clones sont détectés dans les cellules SLTALVFHV positives, pour un index de diversité (Inverse Simpson index) de 1,3 tandis que près de 9 000 clones sont détectés dans l'échantillon négatif et plus de

26 000 clones pour les PBMCs d'origine, avec des index de diversité similaires, soit de 565 et 610 respectivement. Dans tous les cas, il est attendu que les clonotypes abondants soient davantage détectés que les clones rares. Des valeurs élevées de l'Inverse Simpson index indiquent que la distribution des clones TCR est uniforme alors qu'à l'inverse, des valeurs faibles de l'indice indique un enrichissement en clones de cellules T (90).

Pour examiner davantage la diversité clonale de l'échantillon, la mesure de la proportion clonale a ensuite été étudiée. Cette mesure correspond à la composition, en pourcentage, d'un clonotype individuel par rapport au nombre total de clonotypes et sa valeur varie entre 0 et 1. À l'inverse de la mesure de diversité (Inverse Simpson Index), une clonalité élevée signifie un nombre limité de clones et donc une faible diversité (90). Ici, la couleur rouge (1 :1) montre une distribution monoclonale alors que le bleu (10 001 :  $1 \times 10^6$ ) indique un répertoire polyclonal (Figure 12). Sur les 9 différents clones obtenus pour l'échantillon positif, il y a prédominance d'un clone dont la séquence en aa du CDR3 de la chaîne  $\beta$  du TCR est ASSLDVANEQF et représente la majeure partie de l'échantillon, alors que les autres échantillons sont largement polyclonaux.

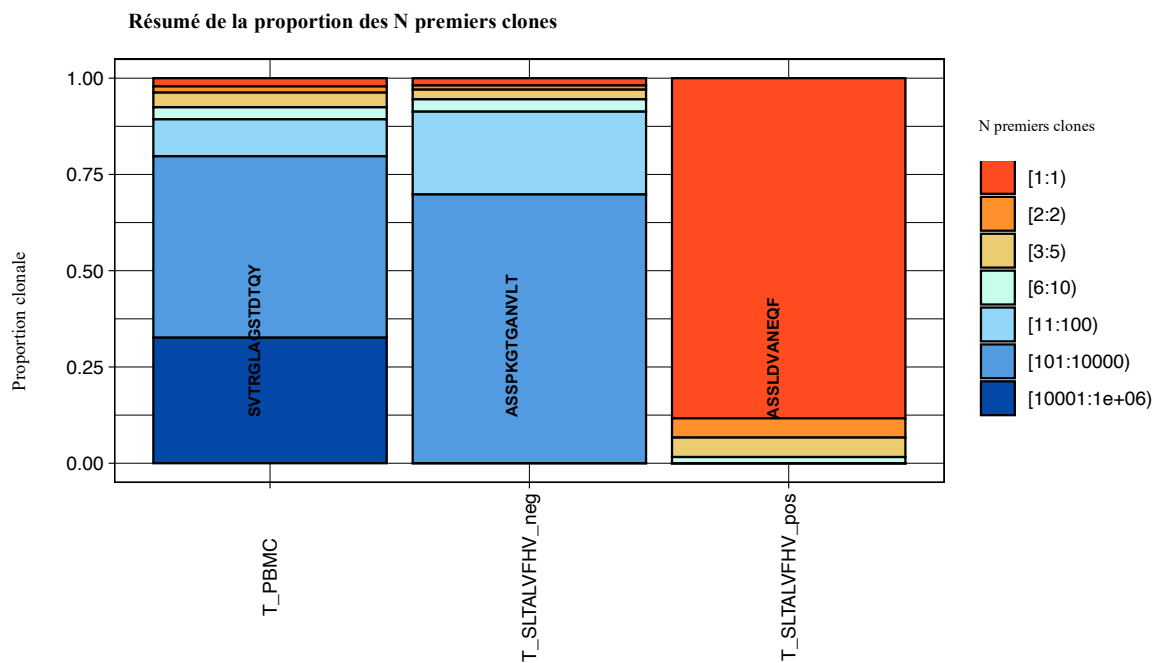
Finalement, une dernière analyse des clonotypes partagés a été effectuée afin d'évaluer le chevauchement des répertoires des trois échantillons, permettant de vérifier si les séquences TCR $\beta$  du répertoire aeTSA spécifique sont détectables dans le matériel d'origine (sang du donneur). Cette mesure utilise le nombre total de séquences partagées entre 2 échantillons donnés, divisé par le nombre total des séquences détectées dans les 2 échantillons. Sa valeur varie entre 0 et 1 et la couleur orange ici indique un nombre de clonotypes partagés plus élevé que la couleur bleue (Figure 13). Les clonotypes retrouvés dans les cellules marquées par le dextramère ne sont pas détectés dans les PBMCs d'origine qui partagent également peu de clonotypes avec les cellules négatives ( $4,20 \times 10^{-7}$ ). Légèrement plus de clones sont partagés entre les cellules positives et négatives, qui ont  $4,96 \times 10^{-5}$  clonotypes communs.

Ces résultats très préliminaires et complétés pour une seule culture suggèrent que le répertoire TCR des cellules dextramère positives sélectionnées après culture provient d'un nombre limité de clones et que le répertoire TCR des cellules répondant aux aeTSA n'est pas abondant chez le sujet sain.



**Figure 11. – Taille et diversité clonales du répertoire TCR des cellules réactives au peptide SLTALVFHV ;  $n = 1$ .**

A, Distribution du nombre de clones CDR3 de la chaîne  $\beta$  du récepteur des cellules PBMCs totales (PBMC), des cellules négatives au dextramère (SLTALVFHV neg) et des cellules positives au dextramère (SLTALVFHV pos). B, Diversité du répertoire TCR des mêmes échantillons évaluée par l'index Simpson inverse.

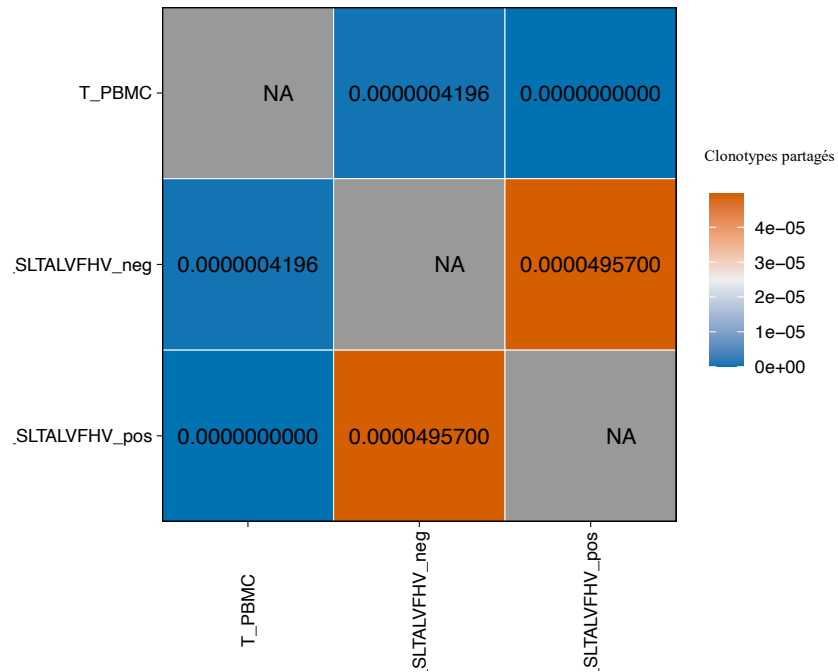


Amino acid sequence	Nucleotide sequence
ASSLDVANEQF	GCCAGCAGCTTGGATGTGGCGAATGAGCAGTTC
ASSRGVMVYEYQ	GCCAGCAGCCGGGGGTCATGGTCTACGAGCAGTAC
ASSLDVQGTQY	GCCAGCAGCTTGGATGTCCAGGGGACCCAGTAC
ASSYSSPAEAF	GCCAGCAGTTACTCGTCGCCAGCTGAAGCTTTC
ASSLEGGTDTQY	GCCAGCAGCTTAGAGGGTGGCACAGATACGAGTAT
ASSLGPAAEF	GCCAGCAGCTTAGGGCCCGCTGAAGCTTTC
ASSLDLNTEAF	GCCAGCAGCTTGGACCTGAACACTGAAGCTTTC
ASSQDMGLSTEAF	GCCAGCAGCCAAGACATGGGCTCTCCACTGAAGCTTTC
ASTLGTEAF	GCCAGCACCTTAGGAACTGAAGCTTTC

**Figure 12. – Proportion des clonotypes les plus abondants parmi les cellules réactives au peptide SLTALVFHV.**

Proportion clonale des N premiers clones (la séquence du premier clone est donnée pour les 3 échantillons) et séquences en aa et en nucléotides des 9 clones des CDR3 des chaînes  $\beta$  des TCR des cellules T répondant au peptide SLTALVFHV. La couleur rouge identifie le premier clone, la couleur orange le deuxième clone, la couleur jaune les clones 3 à 5, la couleur bleu très clair les clones 6 à 10, la couleur bleu clair les clones 11 à 100, la couleur bleu les clones 101 à 10 000 et la couleur bleu foncé les clones 10 001 à 1 000 000.

### Nombre de clonotypes partagés



**Figure 13. – Nombre de clonotypes partagés selon la séquence de nucléotides des CDR3 des chaînes  $\beta$  des TCR.**

*Heatmap* du nombre de clonotypes partagés entre les 3 différents échantillons, basé sur la séquence nucléotidiques des CDR3 des chaînes  $\beta$  des cellules T. NA, non applicable.

## **Discussion et conclusions**

## 8 Discussion

Afin de répondre au premier objectif, soit déterminer si les aeTSA stimulent une réponse immunitaire chez l'humain, des cellules provenant des PBMCs de 7 donneurs sains ont été enrichies de façon immunomagnétique en CD8<sup>+</sup> puis triées. Le tri cellulaire s'effectue à l'aide de dextramères spécifiques aux TSA d'intérêt et est suivi d'un REP par stimulation polyclonale utilisant des anticorps anti-CD3 et de l'IL-2 afin d'augmenter la densité de population cellulaire positive. Cette technique a généré entre 5 et 1125 cellules positives par million de cellules T marquées, soit une moyenne de 169 cellules par million de cellules T marquées et au plus 12 131 cellules totales (Annexe I). Ce nombre de cellules est insuffisant, et ce même après expansion, pour réaliser les étapes subséquentes. En effet, un minimum de 30 000 cellules est généralement requis pour couvrir suffisamment le répertoire de l'échantillon et effectuer les analyses de séquençage envisagées (39). Une deuxième approche pour générer une plus grande proportion de cellules a donc été utilisée. Cette deuxième approche est basée sur la mise en culture de cellules de sang périphérique et de cellules CD8<sup>+</sup> naïves de donneurs sains. L'utilisation de cellules CD8<sup>+</sup> naïves devrait permettre de détecter la présence d'Ag rares. Cependant, l'activation de ces cellules est un processus plus difficile dû à leur phase quiescente et nécessite des signaux de co-stimulation. Leur activation et expansion requiert leur stimulation hebdomadaire avec des CD autologues chargées avec les aeTSA d'intérêt. Cette nouvelle approche a permis l'obtention moyenne de 1000 millions de cellules à 21 jours, composées à 97% de CD3<sup>+</sup> dont 87% sont des cellules CD8<sup>+</sup>. Ces résultats sont comparables à ceux précédemment obtenus au laboratoire lors de génération de lignée de cellules contre des Ag rares (48). L'analyse de la différenciation des cellules montre une évolution de la répartition du phénotype de T<sub>n</sub> vers un mélange de T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub> et quelques T<sub>eff</sub>.

Comme décrit dans l'introduction, les aeTSA ont un potentiel immunogène plus élevé, car le système immunitaire est naïf vis-à-vis ces Ag. En effet, Inderberg et al. ont montré que la vaccination d'un patient atteint d'un cancer du côlon avec un TSA dérivé du récepteur de TGFβ muté a amené une survie au-delà de 10 ans (92). Les CTL de ce patient ont été isolées et utilisées pour générer un clone TCRαβ et transfectées par la suite dans des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Ces cellules transfectées ont montré une efficacité cytotoxique, une sécrétion de cytokines et une efficacité *in vivo* dans un modèle de xélogreffe lorsqu'utilisées dans des lignées cellulaires dans



des cancers de côlon contenant la mutation du récepteur TGF $\beta$ . Nos résultats, quoique préliminaires, semblent corrélérer le potentiel immunogène des aeTSA. Pour le confirmer, la fréquence des cellules T qui répondent aux aeTSA étudiés dans ce projet a été mesurée. La technique de co-culture a généré entre 225 et 6886 cellules positives par million de cellules T marquées, soit 2591 cellules en moyenne par million de cellules T marquées et à l'exception d'un, tous les échantillons contiennent le minimum de 30 000 cellules totales requises (Annexe II). Un total de 10 aeTSA provenant de tumeurs leucémiques ont été étudiés, dont 50% ont montré une réponse CD8 détectable. La réactivité contre les peptides montrée à l'aide du marquage multimère a été confirmée par deux tests fonctionnels. Le premier de ces tests est la mesure du nombre de cellules sécrétant les cytokines intracellulaires IL-2, TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$  et montre la réponse aux différents peptides d'intérêt testés. Le deuxième test fonctionnel est un ELISpot permettant la détection de la réactivité d'un lymphocyte T à un Ag auquel il a été sensibilisé. Contrairement à ce que Roex et al. ont observé en corrélant l'intensité des marquages tétramères des cellules T spécifiques de TAA avec la réactivité aux tests fonctionnels utilisés, ces tests ont permis de confirmer les 5 peptides ayant un potentiel immunogène en accord avec le marquage dextramère (59).

Pour répondre à notre deuxième objectif, c'est-à-dire définir la taille et la diversité du répertoire TCR anti-TSA afin d'identifier les clonotypes qui pourront avoir une potentielle utilisation clinique, le séquençage TCR $\beta$  des lymphocytes T réactifs aux Ag a été effectué et comparé à celui des PBMCs d'origine et à celui des cellules négatives pour l'Ag. Malheureusement, dû aux restrictions d'accès au laboratoire pendant la pandémie, un seul répertoire a pu être séquencé, soit celui en réponse au peptide SLTALVFHV. Un nombre faible de clones (9 clones) a été obtenu pour l'échantillon positif, ce qui confirme l'oligoclonalité, mais qui par contre, ne démontre pas une abondance des répertoires positifs aux TSA. En effet, l'analyse du répertoire TCR des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques aux Ag viraux du cytomégalovirus (peptide NLV) et de l'influenza (peptide GIL) fait état respectivement de 605 et 637 clones uniques en moyenne par sujet (93). Parmi les 9 clones obtenus, un clone, dont la séquence d'aa du CDR3 de la chaîne  $\beta$  du TCR est ASSLDVANEQF, est particulièrement dominant. De façon intéressante, les clones découverts sont trouvés à très faible fréquence, voire indétectable, dans l'échantillon sanguin (PBMC) ayant été utilisé pour faire l'expansion. Ces observations restent toutefois préliminaires puisqu'un seul peptide a été analysé

et qu'une comparaison actuellement investiguée avec la taille des répertoires TCR des lymphocytes T ciblant des Ag viraux ou des TAA permettra de bien situer la taille des répertoires anti-aeTSA par rapport à d'autres cibles.

## **8.1 Choix des cibles antigéniques**

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont les principales cellules impliquées dans l'activité anti-tumorale. Cette activité anti-tumorale se fait dans un contexte de reconnaissance par le CMH des cellules du patient. Parmi les différents Ag tumoraux, sont entre autres retrouvés des TAA ainsi que des TSA. Les premiers sont exprimés sur les cellules saines ainsi que les cellules tumorales, alors que les TSA sont retrouvés uniquement sur les cellules tumorales et de plus, sont inconnus du système immunitaire. Un préalable à l'utilisation thérapeutique des TSA est l'évaluation de leur potentiel immunogène. Ce dernier dépend d'un niveau d'expression suffisant du TSA, mais également de sa localisation intracellulaire pour qu'il puisse entrer dans le protéasome, être digéré, transporté au réticulum endoplasmique et exprimé à la surface des molécules HLA (94). De plus, le complexe avec HLA doit être de haute affinité de manière à assurer la stabilité (du complexe) et la reconnaissance efficace par le répertoire T du patient. L'identification de TSA immunogènes est donc cruciale et s'est faite jusqu'à présent principalement par des techniques de séquençage. La découverte par cette technique d'un nombre important de TSA demeure un défi, car même si ces méthodes sont capables de prédire l'affinité de liaison au HLA, elles ne peuvent prédire la dégradation par le protéasome, le transport des peptides et la stabilité du complexe HLA ainsi que sa reconnaissance par les cellules T (95). De nouvelles approches de découverte de TSA sont donc nécessaires pour pallier à ces lacunes.

### **8.1.1 Origine des TSA**

Les analyses par algorithmes sont basées sur le séquençage de l'exome complet, mais présentent une incapacité à identifier des TSA dans la plupart des cancers. Un des défauts de cette approche est que le séquençage de peptides utilise des bibliothèques de protéines connues, mais ne peut donc identifier une protéine non décrite dans cette bibliothèque. Une autre limite de cette approche est qu'elle n'examine pas les régions non codantes du génome. L'immunopeptidome représente l'ensemble

des peptides associés au CMH (MAP) reconnu par des cellules T CD8<sup>+</sup> (96). Laumont et al. ont montré que l'immunopeptidome est composé non seulement de MAP conventionnels, c'est-à-dire codé par le cadre de lecture de gènes codants pour des protéines, mais aussi de MAP cryptiques, qui eux dérivent de cadres de lecture alternatifs (altORFs) de gènes non codants (97). Ces MAP cryptiques composent environ 10% de l'immunopeptidome. Les TSA étudiés dans ce projet proviennent donc de MAP cryptiques, qui ont été identifiés avec une approche de protéogénomique et de spectrométrie de masse (68). En effet, Perreault et al. ont montré grâce à cette technique ciblant tout le génome, l'identification de TSA non répertoriés. Ces TSA peuvent être mutés (mTSA) ou exprimés de façon aberrante (aeTSA), tel que décrit dans l'introduction.

## 8.2 Limites de l'étude

Plusieurs limites sont associées aux techniques utilisées dans ce projet, dont la disponibilité et l'efficacité des dextramères. En effet, le squelette de dextran des dextramères permet de stabiliser le complexe et les nombreuses molécules CMH permettent de détecter un plus grand nombre de cellules T réactives à un Ag de faible affinité en comparaison aux autres technologies disponibles (multimères, pentamères, tétramères, etc.). En effet, Dorton et al. ont montré que des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> avec TCR plus faibles pouvaient être détectées par marquage avec dextramère, mais pas avec tétramère (98, 99). Cependant, les dextramères étant restreints à des HLA précis, la disponibilité de ces derniers se retrouve diminuée. De plus, l'efficacité des marquages avec dextramères pourrait être améliorée par l'utilisation d'un inhibiteur de phosphate kinase (PKI), tel que publié par Dolton et al. (99). Les auteurs ont comparé le marquage avec et sans dasatinib (PKI) et ont obtenu une augmentation de 4 à 5 fois l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) pour les cellules marquées avec le dextramère incubées avec le PKI.

De par la recombinaison VDJ, l'insertion, la délétion et la substitution des différents gènes TCR, le répertoire TCR humain pourrait théoriquement contenir de 10<sup>15</sup> à 10<sup>20</sup> chaînes TCR différentes. La diversité TCR réelle est cependant estimée au maximum à 10<sup>13</sup> différents clonotypes (39). La limite de détection de séquençage se retrouve toutefois inférieure à la diversité réelle. En effet, le volume de sang prélevé du donneur, la technique de séquençage utilisée ainsi que l'abondance non uniforme des clonotypes sont des facteurs limitants à la détection de tous les clonotypes présents.

De plus, Warren et al. ont montré que même en effectuant un séquençage exhaustif d'un échantillon de sang périphérique, ils n'arrivaient pas à obtenir le répertoire TCR complet et qu'un deuxième séquençage du même échantillon de sang amenait 75% de nouvelles séquences (100).

Une autre limite serait l'introduction d'un biais dans la composition clonotypique lors de la stimulation des cellules T. En effet, celle-ci peut favoriser l'expansion de certains clones plutôt que d'autres et de ce fait, modifier la hiérarchie clonotypique réelle et diminuer la diversité du répertoire TCR (44). Ceci est davantage vrai lorsque la méthode de co-culture est utilisée plutôt que la méthode de stimulation non spécifique par REP, tel qu'observé lors de l'expansion clonale des cellules T du virus de l'immunodéficience humaine (VIH)-spécifiques (101). Ce biais comporte cependant l'avantage de révéler les aeTSA pour lesquels une réponse T immunodominante est observée ainsi que les clonotypes dont l'expansion a été possible *ex vivo*, soit les plus pertinents pour une potentielle utilisation clinique.

Une étape subséquente impliquait de déterminer le répertoire TCR des cellules aeTSA spécifiques des patients atteints de leucémies afin de déterminer comment les traitements de chimiothérapies ont un impact sur la diversité des répertoires. Cependant, nos données ont montré qu'il n'était pas possible de déterminer les répertoires des clonotypes ciblant les aeTSA directement à partir des échantillons sanguins étant donné leur basse fréquence. La technique alternative utilisée (co-culture) nécessite quant à elle un nombre important de cellules, ce qui rend impossible l'utilisation de cellules de patients pour y parvenir.

Il serait également intéressant, dans le but d'augmenter la significativité, d'ajouter des répliques expérimentaux pour chacun des TSA testés.

## **8.3 Implantation clinique**

### **8.3.1 Impact de la diversité des CMH sur le développement thérapeutique**

Parmi les différentes avenues thérapeutiques, une des approches est basée sur l'utilisation des thérapies cellulaires T, mais qui comporte le défi que les TCR sont spécifiques à des peptides

présentés dans le contexte du CMH. Or, la diversité d'allèles du CMH présente de nombreux peptides non chevauchants aux cellules T (102). Toutefois, les différents HLA utilisés dans ce projet sont les HLA-A0201, -A1101, -B0702 et -B0801, dont la fréquence allélique est élevée au sein de la population caucasienne (103). De plus, les travaux de Zhao et al. ont montré que des TSA cryptiques identifiés par spectrométrie de masse sont codés par des transcrits présents de façon fréquente dans des cancers ovariens, ce qui permettrait une utilisation de cette approche dans tous les patients comportant le transcrit en question (77).

### **8.3.2 Immunothérapie adoptive pour le traitement des patients cancéreux**

La thérapie cellulaire adoptive (ACT) est basée sur l'utilisation soit des cellules du patient ayant une réactivité anti-tumorale, soit sur le clonage des lymphocytes T. Une des approches d'immunothérapie développée ayant connu un certain succès est l'utilisation de CART, comme discuté dans l'introduction. Cependant, leur utilisation comporte des limites, notamment, un seul Ag a été incorporé dans cette approche et seuls des cancers hématologiques dans lesquels l'Ag CD19 est présent, peuvent être visés par les CART. De plus, cette technologie est très coûteuse à produire et provoque chez les patients des CRS. Pour ces différentes raisons, après beaucoup d'enthousiasme, d'autres avenues sont explorées.

Une deuxième approche possible est la modification des TCR par clonage. Les cellules T du patient sont isolées du sang périphérique, puis modifiées génétiquement pour exprimer un TCR spécifique à un Ag. L'expansion de ces cellules est réalisée *ex vivo* puis elles sont réinjectées au patient. Cette approche a été utilisée en premier chez des patients atteints de mélanomes métastatiques utilisant des TCR spécifiques pour le TAA MART-1 (104, 105). Cette étude clinique a montré les premiers résultats d'efficacité, mais a aussi montré un effet non spécifique (*on-target/off-tumor*), dû à la présence de MART-1 sur des cellules normales. Une deuxième utilisation du clonage TCR a ciblé l'Ag NY-ESO-1, exprimé dans plusieurs types de cancers épithéliaux (106). Cette étude a montré un taux de réponse de 45% chez des patients atteints de mélanome. A priori, il est possible d'envisager que l'utilisation non pas de TAA, mais de aeTSA contournerait cet effet *on-target/off-tumor*, tout en gardant l'efficacité du clonage de TCR.

### 8.3.2.1 Considérations du clonage TCR

Une approche innovatrice serait le clonage de TCR des cellules T réactives à un aeTSA donné et qui consiste à l'assemblage des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de ces TCR. Parmi les facteurs à considérer pour l'utilisation de cette approche, il y a la méthode de transfection des cellules T, qui comporte beaucoup de variabilité dans l'efficacité et la viabilité des cellules transfectées (107). Un autre facteur à prendre en considération est que cette modalité thérapeutique est basée sur une réponse à un seul Ag. Par ailleurs, cette approche permet de construire un complexe CMH (peptide) – TCR de plus haute affinité, permettant une meilleure reconnaissance de cet Ag. Certaines études ont d'ailleurs montré qu'une affinité entre 1  $\mu$ M et 5  $\mu$ M était la plus efficace pour avoir une réponse cellulaire T *in vivo* (108).

### 8.3.3 Approche vaccinale

Les aeTSA pourraient aussi être utilisés dans une approche vaccinale pouvant contenir plusieurs TSA, ce qui constituerait un avantage majeur puisque le même vaccin pourrait servir au traitement de plusieurs patients. En effet, les résultats d'une récente étude clinique de phase I/II utilisant un vaccin comportant de 4 à 20 mTSA montrent des résultats encourageants (109). Une réponse *ex vivo* CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> contre 99% des Ag utilisés est observée. Une deuxième étude clinique utilisant jusqu'à 20 Ag mutés (KRAS) a également généré une réponse CD8<sup>+</sup> chez les patients ainsi qu'un bénéfice clinique, notamment chez les patients atteints du cancer du poumon (110). Basé sur la fréquence allélique des HLA, les Ag ciblés pourraient être utilisés dans 15% des patients atteints du cancer du côlon et du poumon et 25% des patients atteints de cancer pancréatique. Ces approches vaccinales peuvent aussi être développées en combinaison avec d'autres agents anti-cancéreux, notamment avec tous les inhibiteurs de points de contrôle cellulaire. Il reste cependant à déterminer plusieurs critères scientifiques à leur utilisation. La capacité du nombre d'Ag pris en charge dans la construction vaccinale n'est pas déterminée et les études cliniques à ce jour utilisent une vingtaine d'Ag différents. Les molécules co-stimulatrices optimales (LFA-3, ICAM-1, IL-12) doivent être définies ainsi que le nombre de vaccinations et de rappels nécessaires.

## 8.4 Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans ce mémoire ont répondu aux objectifs fixés, à savoir, déterminer les aeTSA pour lesquels les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont une forte affinité et définir la taille et la diversité du répertoire TCR de ces cellules. Parmi les 10 aeTSA testés, 50% ont montré un potentiel immunogène. Le séquençage de cellules réactives contre un seul aeTSA a été complété à ce jour, montrant une faible taille et diversité du répertoire.

Afin de déterminer si les répertoires TCR des cellules T répondant aux aeTSA sont publics, c'est-à-dire partagés par différents individus, il sera possible de comparer les répertoires TCR de plusieurs donneurs pour un même aeTSA étudié. En effet, des TCR publics sont observés pour différents épitopes du cytomégalo virus (CMV) et du virus d'Epstein-Barr (EBV) chez des individus du même HLA (111) et il en est de même pour certains cancers. Sainz-Perez et al. par exemple, ont montré la présence de TCR publics dans une population de Tregs infiltrant les tumeurs de différents individus (112, 113).

Une fois le séquençage CDR3 des TCR $\beta$  terminé, le focus des études ultérieures se portera sur les aeTSA reconnus par le plus grand nombre de donneurs et dont le répertoire TCR est le plus varié et abondant. En effet, les clonotypes de cellules T de haute avidité seront les plus pertinents pour une utilisation clinique et une étape suivante du projet sera d'obtenir les séquences complètes des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de ces clones. Ceci permettra de cloner les TCR afin de les étudier en tant que potentiels outils de thérapie, en déterminant leur activité cytotoxique *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins.

Afin de mieux caractériser les répertoires TCR des cellules T qui répondent aux aeTSA, une comparaison de la réponse antigénique avec celle d'Ag viraux et de TAA sera effectuée. Par exemple, l'EBV pourra être utilisé, car c'est un agent antigénique riche qui amène de fortes réponses lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> lors d'une infection primaire puis établit une infection à vie, contrôlée par le système immunitaire de l'hôte (114). Plusieurs facteurs font de ce virus un modèle intéressant pour l'étude du système immunitaire chez l'Homme, dont sa stabilité génétique et la connaissance approfondie de ses Ag viraux. Une autre cible pourra servir de comparaison, soit le

TAA WT1, un facteur de transcription surexprimé dans les cancers hématologiques, dont l'utilisation clinique a déjà montré des réponses CD8 détectables (115-117).

Ces travaux permettraient d'approfondir les connaissances nécessaires au développement d'une approche innovatrice pour le traitement de différents cancers. Il serait intéressant d'effectuer ces travaux sur un plus grand nombre d'échantillons afin d'identifier un plus grand nombre d'aeTSA immunogènes, mais également pour différents types de cancers. Une modalité thérapeutique utilisant différents aeTSA contre différents cancers serait alors envisageable.



## Bibliographie

1. Judy Owen JP, Sharon Stranford. Immunologie. Le cours de Janis Kuby. Sciences Sup, Dunod ed2014.
2. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science*. 2010;327(5963):291-5.
3. Medzhitov RaJ, C.J. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*. 2000;173(1):89-97.
4. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2009;227(1):221-33.
5. Gaudino SJ, Kumar P. Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. *Front Immunol*. 2019;10(360).
6. Hughes CE, Benson RA, Bedaj M, Maffia P. Antigen-Presenting Cells and Antigen Presentation in Tertiary Lymphoid Organs. *Front Immunol*. 2016;7(481).
7. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:443-73.
8. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;14:301-23.
9. Halenius A, Gerke C, Hengel H. Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: so many targets—but how many arrows in the quiver? *Cellular & Molecular Immunology*. 2015;12(2):139-53.
10. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2017;8(292).
11. Norman PJ, Norberg SJ, Guethlein LA, Nemat-Gorgani N, Royce T, Wroblewski EE, et al. Sequences of 95 human MHC haplotypes reveal extreme coding variation in genes other than highly polymorphic HLA class I and II. *Genome Res*. 2017;27(5):813-23.
12. Cano RLE LH. Introduction to T and B lymphocytes. In: Anaya JM SY, Rojas-Villarraga A, et al., editor. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. El Rosario University Press2013.
13. Alberts B JA, Lewis J, et al. Helper T Cells and Lymphocyte Activation. In: Science G, editor. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition ed2002.
14. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89.
15. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(3):333-40.
16. Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine. *The Journal of Immunology*. 2003;171(10):5165-71.
17. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):671-84.
18. Cho BK, Wang C, Sugawa S, Eisen HN, Chen J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):2976-81.

19. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.
20. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9571-6.
21. Guram K, Kim SS, Wu V, Sanders PD, Patel S, Schoenberger SP, et al. A Threshold Model for T-Cell Activation in the Era of Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10(491).
22. Martin MD, Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol*. 2018;9(2692).
23. Schwendemann J, Choi C, Schirmacher V, Beckhove P. Dynamic Differentiation of Activated Human Peripheral Blood CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> Effector Memory T Cells. *The Journal of Immunology*. 2005;175(3):1433-9.
24. Krzewski K, Gil-Krzewska A, Nguyen V, Peruzzi G, Coligan JE. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*. 2013;121(23):4672-83.
25. Sudworth A, Dai K-Z, Vaage JT, Kveberg L. Degranulation Response in Cytotoxic Rat Lymphocytes Measured with a Novel CD107a Antibody. *Front Immunol*. 2016;7(572).
26. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48(2):202-13.
27. Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*. 2002;17(6):749-56.
28. Spits H. Development of  $\alpha\beta$  T cells in the human thymus. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(10):760-72.
29. Shah DK, Zúñiga-Pflücker JC. An Overview of the Intrathymic Intricacies of T Cell Development. *The Journal of Immunology*. 2014;192(9):4017-23.
30. Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, Michaud H-A, Gros L, Eliaou J-F, et al. Plasticity of gamma delta T cells: impact on the anti-tumor response. *Front Immunol*. 2014;5(622).
31. Kurd N, Robey EA. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev*. 2016;271(1):114-26.
32. Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol*. 2010;11(8):666-73.
33. Baldwin KK, Trenchak BP, Altman JD, Davis3 MM. Negative Selection of T Cells Occurs Throughout Thymic Development. *The Journal of Immunology*. 1999;163(2):689-98.
34. Turner SJ, La Gruta NL, Kedzierska K, Thomas PG, Doherty PC. Functional implications of T cell receptor diversity. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(3):286-90.
35. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619.
36. Rabbitts TH, Lefranc MP, Stinson MA, Sims JE, Schroder J, Steinmetz M, et al. The chromosomal location of T-cell receptor genes and a T cell rearranging gene: possible correlation with specific translocations in human T cell leukaemia. *Embo j*. 1985;4(6):1461-5.
37. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*. 2002;109 Suppl:S45-55.
38. Dupic T, Marcou Q, Walczak AM, Mora T. Genesis of the  $\alpha\beta$  T-cell receptor. *PLoS Comput Biol*. 2019;15(3):e1006874.

39. Rosati E, Dowds CM, Liaskou E, Henriksen EKK, Karlsen TH, Franke A. Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. *BMC Biotechnol.* 2017;17(1):61-.
40. De Simone M, Rossetti G, Pagani M. Single Cell T Cell Receptor Sequencing: Techniques and Future Challenges. *Front Immunol.* 2018;9:1638.
41. Yassai MB, Naumov YN, Naumova EN, Gorski J. A clonotype nomenclature for T cell receptors. *Immunogenetics.* 2009;61(7):493-502.
42. Chu ND, Bi HS, Emerson RO, Sherwood AM, Birnbaum ME, Robins HS, et al. Longitudinal immunosequencing in healthy people reveals persistent T cell receptors rich in highly public receptors. *BMC Immunology.* 2019;20(1):19.
43. Mora T, Walczak AM. How many different clonotypes do immune repertoires contain? *bioRxiv.* 2019:707885.
44. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee J-Y, et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014;111(36):13139-44.
45. Thome JJ, Grinshpun B, Kumar BV, Kubota M, Ohmura Y, Lerner H, et al. Longterm maintenance of human naive T cells through in situ homeostasis in lymphoid tissue sites. *Sci Immunol.* 2016;1(6).
46. Doumbia M, Uwingabiye J, Bissan A, Rachid R, Benkirane S, Masrar A. [Epidemiological, clinical, cytologic and immunophenotypic aspects of acute leukemia in children: the experience at the hematology laboratory of IBN SINA University Hospital Center]. *Pan Afr Med J.* 2016;23:258.
47. Perica K, Varela JC, Oelke M, Schneck J. Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides Med J.* 2015;6(1):e0004.
48. Orio J, Carli C, Janelle V, Giroux M, Taillefer J, Goupil M, et al. Early exposure to interleukin-21 limits rapidly generated anti-Epstein-Barr virus T-cell line differentiation. *Cytotherapy.* 2015;17(4):496-508.
49. Braun DA, Wu CJ. Antigen Discovery and Therapeutic Targeting in Hematologic Malignancies. *Cancer J.* 2017;23(2):115-24.
50. Ehx G, Perreault C. Discovery and characterization of actionable tumor antigens. *Genome Medicine.* 2019;11(1):29.
51. Andre T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt CJA, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: The phase 3 KEYNOTE-177 Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2020;38(18\_suppl):LBA4-LBA.
52. Wolchok JD, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, Maio M, Schadendorf D, et al. Ipilimumab efficacy and safety in patients with advanced melanoma: a retrospective analysis of HLA subtype from four trials. *Cancer Immun.* 2010;10:9.
53. Wang RF, Wang HY. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Res.* 2017;27(1):11-37.
54. Klempner SJ, Fabrizio D, Bane S, Reinhart M, Peoples T, Ali SM, et al. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker for Response to Immune Checkpoint Inhibitors: A Review of Current Evidence. *Oncologist.* 2020;25(1):e147-e59.
55. Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, Kurzrock R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell.* 2020.
56. Osipov A, Lim SJ, Popovic A, Azad NS, Laheru DA, Zheng L, et al. Tumor Mutational Burden, Toxicity, and Response of Immune Checkpoint Inhibitors Targeting PD(L)1,

- CTLA-4, and Combination: A Meta-regression Analysis. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(18):4842.
57. Bastien JP, Minguy A, Dave V, Roy DC. Cellular therapy approaches harnessing the power of the immune system for personalized cancer treatment. *Semin Immunol*. 2019;42:101306.
  58. Griffioen M, van Bergen CA, Falkenburg JH. Autosomal Minor Histocompatibility Antigens: How Genetic Variants Create Diversity in Immune Targets. *Front Immunol*. 2016;7:100.
  59. Roex MCJ, Hageman L, Veld SAJ, van Egmond E, Hoogstraten C, Stemberger C, et al. A minority of T cells recognizing tumor-associated antigens presented in self-HLA can provoke antitumor reactivity. *Blood*. 2020;136(4):455-67.
  60. Korngold R, Sprent J. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med*. 1978;148(6):1687-98.
  61. Spierings E, Hendriks M, Absi L, Canossi A, Chhaya S, Crowley J, et al. Phenotype Frequencies of Autosomal Minor Histocompatibility Antigens Display Significant Differences among Populations. *PLOS Genetics*. 2007;3(6):e103.
  62. Zilberberg J, Feinman R, Korngold R. Strategies for the identification of T cell-recognized tumor antigens in hematological malignancies for improved graft-versus-tumor responses after allogeneic blood and marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(6):1000-7.
  63. Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:14.
  64. Raza A, Merhi M, Inchakalody VP, Krishnankutty R, Relecom A, Uddin S, et al. Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy. *Journal of Translational Medicine*. 2020;18(1):140.
  65. McGregor RJ, Chau YY, Kendall TJ, Artibani M, Hastie N, Hadoke PWF. WT1 expression in vessels varies with histopathological grade in tumour-bearing and control tissue from patients with breast cancer. *Br J Cancer*. 2018;119(12):1508-17.
  66. Al-Khadairi G, Naik A, Thomas R, Al-Sulaiti B, Rizly S, Decock J. PRAME promotes epithelial-to-mesenchymal transition in triple negative breast cancer. *J Transl Med*. 2019;17(1):9.
  67. Smith CC, Selitsky SR, Chai S, Armistead PM, Vincent BG, Serody JS. Alternative tumour-specific antigens. *Nature Reviews Cancer*. 2019;19(8):465-78.
  68. Laumont CM, Vincent K, Hesnard L, Audemard É, Bonneil É, Laverdure J-P, et al. Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Science Translational Medicine*. 2018;10(470):eaau5516.
  69. Gee MH, Han A, Lofgren SM, Beausang JF, Mendoza JL, Birnbaum ME, et al. Antigen Identification for Orphan T Cell Receptors Expressed on Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Cell*. 2018;172(3):549-63.e16.
  70. Chong C, Müller M, Pak H, Harnett D, Huber F, Grun D, et al. Integrated proteogenomic deep sequencing and analytics accurately identify non-canonical peptides in tumor immunopeptidomes. *Nature Communications*. 2020;11(1):1293.
  71. Hogan WJ, Deeg HJ. Stem cell transplantation: graft-mediated antileukemia effects. *Methods Mol Med*. 2005;109:421-44.
  72. Fernandes SR, Alves AT, Cortes MB, Cortez-Pinto H. Graft-versus-host disease: unexpected presentation with simultaneous hepatitis and pancreatitis. *BMJ Case Rep*. 2016;2016.

73. Comoli P, Basso S, Riva G, Barozzi P, Guido I, Gurrado A, et al. BCR-ABL-specific T-cell therapy in Ph<sup>+</sup> ALL patients on tyrosine-kinase inhibitors. *Blood*. 2017;129(5):582-6.
74. Wall DA, Krueger J. Chimeric antigen receptor T cell therapy comes to clinical practice. *Curr Oncol*. 2020;27(Suppl 2):S115-s23.
75. Zhao W, Wu J, Chen S, Zhou Z. Shared neoantigens: ideal targets for off-the-shelf cancer immunotherapy. *Pharmacogenomics*. 2020;21(9):637-45.
76. Viatte S, Alves PM, Romero P. Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: Advantages and hurdles. *Immunology & Cell Biology*. 2006;84(3):318-30.
77. Zhao Q, Laverdure J-P, Lanoix J, Durette C, Côté C, Bonneil É, et al. Proteogenomics Uncovers a Vast Repertoire of Shared Tumor-Specific Antigens in Ovarian Cancer. *Cancer Immunology Research*. 2020;8(4):544-55.
78. Hu Z, Anandappa AJ, Sun J, Kim J, Leet DE, Bozym DJ, et al. A cloning and expression system to probe T-cell receptor specificity and assess functional avidity to neoantigens. *Blood*. 2018;132(18):1911-21.
79. Emens LA, Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(5):436-43.
80. Biernacki MA, Brault M, Bleakley M. T-Cell Receptor-Based Immunotherapy for Hematologic Malignancies. *Cancer J*. 2019;25(3):179-90.
81. Guo XZ, Dash P, Calverley M, Tomchuck S, Dallas MH, Thomas PG. Rapid cloning, expression, and functional characterization of paired  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cell receptor chains from single-cell analysis. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:15054.
82. Avigan D, Rosenblatt J. Vaccine therapy in hematologic malignancies. *Blood*. 2018;131(24):2640-50.
83. Peng M, Mo Y, Wang Y, Wu P, Zhang Y, Xiong F, et al. Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy. *Molecular Cancer*. 2019;18(1):128.
84. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;7(6):e577.
85. Wenbo L, Wang J. Uncovering the underlying mechanism of cancer tumorigenesis and development under an immune microenvironment from global quantification of the landscape. *Journal of The Royal Society Interface*. 2017;14(131):20170105.
86. Koury J, Lucero M, Cato C, Chang L, Geiger J, Henry D, et al. Immunotherapies: Exploiting the Immune System for Cancer Treatment. *J Immunol Res*. 2018;2018:9585614.
87. Massilamany C, Krishnan B, Reddy J. Major Histocompatibility Complex Class II Dextramers: New Tools for the Detection of antigen-Specific, CD4 T Cells in Basic and Clinical Research. *Scand J Immunol*. 2015;82(5):399-408.
88. Janelle V, Carli C, Taillefer J, Orio J, Delisle JS. Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *J Transl Med*. 2015;13:123.
89. Butler MO, Imataki O, Yamashita Y, Tanaka M, Ansén S, Berezovskaya A, et al. Ex vivo expansion of human CD8<sup>+</sup> T cells using autologous CD4<sup>+</sup> T cell help. *PLoS One*. 2012;7(1):e30229.
90. Aversa I, Malanga D, Fiume G, Palmieri C. Molecular T-Cell Repertoire Analysis as Source of Prognostic and Predictive Biomarkers for Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7).

91. Farmanbar A, Kneller R, Firouzi S. RNA sequencing identifies clonal structure of T-cell repertoires in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *npj Genomic Medicine*. 2019;4(1):10.
92. Inderberg EM, Walchli S, Myhre MR, Trachsel S, Almasbak H, Kvalheim G, et al. T cell therapy targeting a public neoantigen in microsatellite instable colon cancer reduces in vivo tumor growth. *Oncoimmunology*. 2017;6(4):e1302631.
93. Chen G, Yang X, Ko A, Sun X, Gao M, Zhang Y, et al. Sequence and Structural Analyses Reveal Distinct and Highly Diverse Human CD8(+) TCR Repertoires to Immunodominant Viral Antigens. *Cell Rep*. 2017;19(3):569-83.
94. Karpanen T, Olweus J. The Potential of Donor T-Cell Repertoires in Neoantigen-Targeted Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017;8:1718-.
95. Capietto A-H, Jhunjhunwala S, Pollock SB, Lupardus P, Wong J, Hänisch L, et al. Mutation position is an important determinant for predicting cancer neoantigens. *Journal of Experimental Medicine*. 2020;217(4).
96. Granados DP, Sriranganadane D, Daouda T, Zieger A, Laumont CM, Caron-Lizotte O, et al. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nature Communications*. 2014;5(1):3600.
97. Laumont CM, Daouda T, Laverdure J-P, Bonneil É, Caron-Lizotte O, Hardy M-P, et al. Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nature Communications*. 2016;7(1):10238.
98. Dolton G, Lissina A, Skowera A, Ladell K, Tungatt K, Jones E, et al. Comparison of peptide-major histocompatibility complex tetramers and dextramers for the identification of antigen-specific T cells. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(1):47-63.
99. Dolton G, Zervoudi E, Rius C, Wall A, Thomas HL, Fuller A, et al. Optimized Peptide–MHC Multimer Protocols for Detection and Isolation of Autoimmune T-Cells. *Front Immunol*. 2018;9(1378).
100. Warren RL, Freeman JD, Zeng T, Choe G, Munro S, Moore R, et al. Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes. *Genome Res*. 2011;21(5):790-7.
101. Kolowos W, Schmitt M, Herrman M, Harrer E, Löw P, Kalden JR, et al. Biased TCR Repertoire in HIV-1-Infected Patients Due to Clonal Expansion of HIV-1-Reverse Transcriptase-Specific CTL Clones. *The Journal of Immunology*. 1999;162(12):7525-33.
102. Pearson H, Daouda T, Granados DP, Durette C, Bonneil E, Courcelles M, et al. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J Clin Invest*. 2016;126(12):4690-701.
103. Neville MJ, Lee W, Humburg P, Wong D, Barnardo M, Karpe F, et al. High resolution HLA haplotyping by imputation for a British population bioresource. *Human Immunology*. 2017;78(3):242-51.
104. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006;314(5796):126-9.
105. Burns WR, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Lack of specific gamma-retroviral vector long terminal repeat promoter silencing in patients receiving genetically engineered lymphocytes and activation upon lymphocyte restimulation. *Blood*. 2009;114(14):2888-99.

106. Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, et al. Tumor Antigen Expression in Melanoma Varies According to Antigen and Stage. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(3):764-71.
107. Green EW, Bunse L, Bozza M, Sanghvi K, Platten M. TCR validation toward gene therapy for cancer. *Methods Enzymol*. 2019;629:419-41.
108. Hebeisen M, Oberle SG, Presotto D, Speiser DE, Zehn D, Rufer N. Molecular insights for optimizing T cell receptor specificity against cancer. *Front Immunol*. 2013;4:154-.
109. Cohen RB, editor GEN-009, a neoantigen vaccine containing ATLAS selected neoantigens, to generate broad sustained immunity against immunogenic tumor mutations and avoid inhibitory peptides2020; ASCO Virtual Scientific Program: American Society of Clinical Oncology.
110. Drake CG, Johnson ML, Spira AI, Manji GA, Carbone DP, Henick BS, et al. Personalized viral-based prime/boost immunotherapy targeting patient-specific or shared neoantigens: Immunogenicity, safety, and efficacy results from two ongoing phase I studies. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(15\_suppl):3137-.
111. Venturi V, Chin HY, Asher TE, Ladell K, Scheinberg P, Bornstein E, et al. TCR beta-chain sharing in human CD8+ T cell responses to cytomegalovirus and EBV. *J Immunol*. 2008;181(11):7853-62.
112. Li B, Li T, Pignon JC, Wang B, Wang J, Shukla SA, et al. Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers. *Nat Genet*. 2016;48(7):725-32.
113. Sainz-Perez A, Lim A, Lemercier B, Leclerc C. The T-cell receptor repertoire of tumor-infiltrating regulatory T lymphocytes is skewed toward public sequences. *Cancer Res*. 2012;72(14):3557-69.
114. Long HM, Meckiff BJ, Taylor GS. The T-cell Response to Epstein-Barr Virus—New Tricks From an Old Dog. *Front Immunol*. 2019;10(2193).
115. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, Chaney CN, Pufnock JS, Schmitt TM, et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med*. 2013;5(174):174ra27.
116. Chapuis AG, Egan DN, Bar M, Schmitt TM, McAfee MS, Paulson KG, et al. T cell receptor gene therapy targeting WT1 prevents acute myeloid leukemia relapse post-transplant. *Nat Med*. 2019;25(7):1064-72.
117. Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, Fujiwara H, Nishida T, Akatsuka Y, et al. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood*. 2017;130(18):1985-94.





# **Annexes**

## 9 Annexes

### 9.1 Annexe I

Tableau 1. – Fréquence des cellules multimères positives utilisant la technique de REP

Séquence peptidique	Nombre de cellules multimères positives	Nombre de cellules marquées	Fréquence des cellules multimères+/million de cellules marquées
KISLYLPAL (D1)	49	8,1x10 <sup>6</sup>	6,0
SLTALVFHV	116	21,5x10 <sup>6</sup>	5,4
VPAALKSL	107	21,5x10 <sup>6</sup>	5,0
KILILLQSL	176	12,9x10 <sup>6</sup>	13,6
ILASHNLTV	210	26,9x10 <sup>6</sup>	7,8
KISLYLPAL (D2)	12131	10,8x10 <sup>6</sup>	1125
KISLYLPAL (D3)	306	18,3x10 <sup>6</sup>	16,7

## 9.2 Annexe II

Tableau 2. – Fréquence des cellules multimères positives utilisant la technique de co-culture

Séquence peptidique	Nombre de cellules multimères positives	Nombre de cellules marquées	Fréquence des cellules multimères+/million de cellules marquées
KISLYLPAL	323 624	47x10 <sup>6</sup>	6886
SLTALVFHV	48 471	46x10 <sup>6</sup>	1054
ILASHNLTV	6 539	29x10 <sup>6</sup>	225
SLLSGLLRA	32 497	45x10 <sup>6</sup>	722
ALDPLLLRI	158 619	39x10 <sup>6</sup>	4067