



**HAL**  
open science

# Immunomodulateurs de la voie de présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) aux propriétés anti-tumorales

Romain Darrigrand

► **To cite this version:**

Romain Darrigrand. Immunomodulateurs de la voie de présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) aux propriétés anti-tumorales. Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS066 . tel-03154681

**HAL Id: tel-03154681**

**<https://theses.hal.science/tel-03154681>**

Submitted on 1 Mar 2021

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

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

Immunomodulateurs de la voie de  
présentation antigénique par le Complexe  
Majeur d'Histocompatibilité de classe I  
(CMH-I) aux propriétés antitumorales

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 582 : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé (CBMS)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Inserm,

Immunologie des tumeurs et Immunothérapie, 94805, Villejuif, France.

Référent : Faculté de Médecine

**Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 25 mai 2020, par**

**Romain DARRIGRAND**

**Composition du Jury**

**Dr. Loredana SAVEANU**

DR2 INSERM, Université de Paris

Présidente

**Dr. Nathalie BONNEFOY**

DR2 INSERM, Université de Montpellier

Rapporteur et Examinatrice

**Dr. Anne HOSMALIN**

DR1 INSERM/CNRS, Université de Paris

Rapporteur et Examinatrice

**Dr. Aurélien MARABELLE**

Directeur clinique, Université Paris-Saclay

Examineur

**Dr. Eliane PIAGGIO**

DR2 INSERM, Sorbonne Université

Examinatrice

**Dr. Sébastien APCHER**

Chef d'équipe INSERM, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

*A ma famille,*

# Remerciements

---

J'adresse mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie les Drs Nathalie Bonnefoy et Anne Hosmalin pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit et leurs précieux commentaires. Merci aux Drs Eliane Piaggio et Loredana Saveanu pour m'avoir conseillé et soutenu pendant mes comités de suivi de thèse et pour avoir accepté d'être examinatrices le jour de ma soutenance. Merci enfin au Dr. Aurélien Marabelle pour apporter un point de vue clinique dans mon jury.

Je remercie mon directeur de thèse, le Dr Sébastien Apcher pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Sébastien, merci de m'avoir fait confiance dès le début en me présentant au concours Philantropia sans m'avoir jamais rencontré. J'ai été attiré par le sujet de thèse que tu m'avais proposé par téléphone, même si celui-ci a bien évolué depuis, et j'ai gardé tout au long de ma thèse un intérêt pour ces peptides non-conventionnels qui sont au cœur de tes travaux de recherche. Tu m'as laissé beaucoup de liberté dans la gestion de mon projet de thèse, cela a parfois été dur à assumer mais cela a grandement renforcé mon autonomie et mon esprit critique. Je souhaite à ton équipe de nombreux succès scientifiques.

Je remercie nos collaborateurs de l'équipe CoSMIT qui m'ont permis d'entretenir mes connaissances en chimie. Merci en particulier au Dr Mouad Alami pour ses discussions scientifiques enrichissantes, sa disponibilité et sa bienveillance. Merci au Dr Abdallah Hamze ainsi qu'à Dolor, Ilhem, Timothée, Expedite et Diana pour votre participation à ce projet. Tout mon travail repose sur les molécules que vous avez synthétisées.

Merci à Camille Garcia pour avoir réalisé les analyses de protéomiques au sein de l'Institut Jacques Monod, pour l'efficacité de son travail et sa réactivité.

Je remercie également le Prof. Dr. Stefan Stevanović et Michael Ghosh pour avoir partagé avec notre équipe la technique d'immunoprécipitation des molécules du CMH-I et pour nous avoir fourni gracieusement les anticorps.

Merci Alison pour ton soutien quand tu étais au labo et maintenant en dehors. Merci de toujours m'inciter à me poser des questions, c'est avec toi que j'ai eu les réflexions scientifiques les plus constructives. Merci de partager ta bonne humeur et ton entrain, je suis très heureux que l'on puisse maintenant se voir en amis :) Merci à toi aussi Mathilde de m'avoir bien accueilli et formé, je garde de très bons souvenirs de la « première » équipe Apcher. Valérie, Val, ça a été un vrai plaisir de faire ta rencontre et de travailler avec toi au quotidien. Tu sais être sérieuse et rigoureuse quand il le faut et débordante d'énergie quand il s'agit de rigoler, de chanter et de s'amuser. Tu es une vraie source de bonne humeur pour l'équipe, merci ! Merci Marine de m'avoir fait comprendre quelques notions de bio-informatique, je parlais de loin. Merci pour ton travail méticuleux. Merci Sarah pour ta

curiosité et ton intérêt et bonne chance pour ta thèse ! Enfin merci à Jenny, Anne et Ashley d'avoir apporté un peu de nouveauté dans notre bureau. Finalement, on est bien au B2M ;)

Merci justement à tout le 2<sup>ème</sup> étage du B2M ! Chacun de vous fait de ces deux couloirs austères un endroit où l'on prend plaisir à travailler. Merci pour tous ces fous rires et ces discussions, parfois sérieuses, en salle de pause, à la cantine ou autour du babyfoot.

Merci à tous les membres de l'U1015. En particulier, merci Aurélie d'avoir toujours été disponible pour m'aider à mettre au point une manip ou me dépanner quand je manquais de matériel. Tu m'as apporté le point de vue d'une post-doc que nous n'avions pas dans notre équipe. Merci également à Sandrine pour ses conseils et ses explications. Merci enfin à Nathalie, Claudine, Amélie et Maria qui nous facilitent le travail au quotidien.

Merci Laure de t'être bien occupé de mes souris et merci pour ta gentillesse ! Merci également à Christophe pour son aide dans les injections i.v. qui m'ont donné du fil à retordre.

Merci à tous les doctorants qui ont donné de leur temps pour faire vivre l'association POP'418. Cela a toujours été un plaisir de se retrouver après une journée de manips.

Merci à l'équipe pédagogique de l'Ecole Doctorale de Cancérologie, en particulier à Léa Poisot, pour son efficacité et pour le soutien apporté à l'association des doctorants.

Thank you Pr. Carlie de Vries for welcoming me at the AMC for my end-of-study internship. Thank you Duco for teaching me the basics of molecular biology, you strengthened my wish to go for a PhD.

Merci à la MISS et aux personnes qui la font vivre : tous les doctorants mais surtout Valérie, Elisabeth et Sylvie ! J'ai passé de très bons moments avec vous en animant ces ateliers scientifiques pendant deux ans.

Merci à tous mes amis, ceux de Montaigne et les Tapas de l'ENSCM. Vous m'apportez beaucoup de joie et de soutien, même à distance. Merci Hélène d'avoir relu ma thèse et désolé pour ce mauvais moment ;)

Merci Julien pour tout le bonheur que tu m'apportes. Merci pour ton écoute, merci d'essayer de comprendre ce que je fais et parfois juste de m'écouter me plaindre. Merci de traverser la France toutes les deux semaines pour être à mes côtés et à notre nouvelle vie dans le Sud !

Merci papa et maman pour votre soutien sans faille. Votre fierté me pousse à donner le meilleur de moi-même, c'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Merci à toute ma famille pour votre amour.

# Avant propos

---

D'après le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de septembre 2018, le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde avec près de 9 millions de décès par cancer enregistrés sur l'année 2015. Les efforts de la communauté scientifique portent à la fois sur la prévention, la détection et le traitement de la maladie. L'usage des immunothérapies a révolutionné la prise en charge des patients en proposant un ciblage du système immunitaire et non pas de la cellule cancéreuse. Le plus grand succès à ce jour reste le développement en clinique d'anticorps monoclonaux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires. Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont pour but d'identifier des petites molécules immunomodulatrices qui modifient les interactions entre la tumeur et le système immunitaire environnant. En particulier, nous cherchons à contrer le phénomène d'immunoédition tumorale en stimulant la présentation antigénique dans les cellules cancéreuses pour faciliter leur reconnaissance et leur élimination par le système immunitaire.

Ainsi, nous commencerons une partie introductive par la description détaillée des mécanismes de présentation des antigènes dans les cellules cancéreuses. Par la suite, nous replacerons ce processus dans le contexte plus global de la réponse immunitaire antitumorale et nous nous intéresserons en particulier aux modifications induites par le système immunitaire sur la tumeur, et inversement. Enfin, nous expliquerons comment nos connaissances des interactions entre la tumeur et le système immunitaire peuvent être mises à profit pour développer des immunothérapies antitumorales.

La partie « Résultats » s'articule en trois parties correspondant à trois familles de molécules qui ont montré des propriétés immunomodulatrices sur la voie de présentation antigénique par le CMH-I se traduisant par une activité antitumorale. L'ensemble des résultats fait l'objet d'une « Discussion » générale permettant de mettre en lien les différents projets.

# Table des matières

---

Liste des figures .....	11
Liste des tableaux .....	14
Abréviations .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Introduction .....	17
I – Molécules du Complexe Majeur d’Histocompatibilité (CMH) et présentation antigénique .....	17
1. Les molécules du CMH de classe I (CMH-I) et du CMH de classe II (CMH-II) .....	17
1.1 Histocompatibilité .....	17
1.2 CMH et réaction immunitaire .....	18
1.3 Structures des molécules du CMH .....	20
2. Les voies de présentation des antigènes par les molécules du CMH .....	23
2.1 Caractéristiques générales des voies de présentation des antigènes .....	23
2.2 Les étapes de la voie de présentation antigénique par le CMH-I .....	27
3. Sources des antigènes pour la voie de présentation par le CMH-I .....	35
3.1 Deux modèles complémentaires .....	35
3.2 Voies de traductions non-canoniques .....	38
3.3 Compartimentation de la traduction et sélection préférentielle des pCMH-I .....	42
II – La réponse immunitaire antitumorale .....	44
1. La tumeur et son microenvironnement immunitaire .....	44
1.1 Lymphocytes .....	45
1.2 Cellules myéloïdes .....	47
1.3 Valeur pronostique de l’infiltrat immunitaire .....	50
2. Immunosurveillance et immunoédition tumorale .....	52
2.1 Détection et élimination de la tumeur par le système immunitaire – Immunosurveillance des tumeurs .....	52

2.2 Adaptation de la tumeur et échappement au système immunitaire – Immunoédition tumorale.....	57
3. L’immunopeptidome de la cellule tumorale .....	59
3.1 Antigènes associés à la tumeur (TAAs) et antigènes spécifiques de la tumeur (TSAs).....	59
3.2 Techniques d’identification de néoantigènes et d’analyse de l’immunopeptidome.....	65
III – Immunothérapie antitumorale et immunomodulateurs .....	70
1. Définitions .....	70
2. Ciblage thérapeutique d’un antigène tumoral .....	71
2.1 Les vaccins thérapeutiques.....	71
2.2 Le transfert adoptif de cellule.....	74
3. Les combinaisons de traitements.....	79
3.1 Choisir un bon adjuvant .....	79
3.2 Lever les freins de la réponse immunitaire .....	81
3.3 Combattre l’environnement immunosuppresseur .....	83
3.4 Affaiblir la tumeur.....	85
Objectifs .....	91
Résultats .....	93
I – Etude du composé IP2 : mode d’action, impact sur l’immunopeptidome du CMH-I et applications en vaccination contre le cancer .....	93
1. Contexte .....	93
2. Mode d’action du composé IP2.....	94
2.1 IP2 n’a pas d’effet cytotoxique sur les cellules tumorales .....	94
2.2 IP2 n’influe pas sur l’expression des molécules de CMH-I à la surface cellulaire .....	97
2.3 IP2 et l’isoginkgetine ont des activités proches mais non identiques .....	99
2.4 L’effet d’IP2 est dépendant de la réponse immunitaire et des LT CD8 <sup>+</sup> .....	105
3. Effet d’IP2 sur l’immunopeptidome du CMH I.....	108
3.1 IP2 modifie la présentation d’épitopes conventionnels et non-conventionnels ...	108

3.2 IP2 induit des néoantigènes à la surface des cellules tumorales .....	122
4. Stratégies de vaccination peptidique – Combinaisons IP2/peptide.....	124
4.1 Pré-sélection des peptides candidats .....	124
4.2 Vaccination prophylactique.....	131
4.3 Vaccination thérapeutique.....	133
4.4 Combinaison de la vaccination peptidique et de l’anti-PD-1 en thérapeutique ...	136
II – Propriétés immunomodulatrices de la madrasine et de ses dérivés.....	141
1. Contexte .....	141
2. Brevet : Madrasin-derivative compounds, composition and uses thereof for treating cancer (EP/2018/406499.7).....	142
III – Agents antitumoraux multi-cibles : antivasculaires aux propriétés immunomodulatrices.....	198
1. Contexte .....	198
2. Brevet : Composés à activité inhibitrice de la polymérisation de la tubuline et aux propriétés immunomodulatrices (WO/2019/207257). .....	198
3. Activité antitumorale des composés multi-cibles.....	199
Discussion .....	206
Conclusions et perspectives .....	220
Matériels et méthodes.....	222
I – Culture cellulaire et traitements .....	222
1. Maintenance des lignées cellulaires .....	222
2. Transfection de plasmides.....	223
3. Traitements avec les drogues .....	223
4. Evaluation de la toxicité des composés par test MTT.....	223
5. Génération et culture des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) .....	224
II – Test de présentation antigénique in vitro.....	225
1. Préparation des cellules tumorales avant co-culture .....	225

2. Co-culture des cellules tumorales et des hybridomes B3Z .....	225
3. Révélation du test .....	225
III – Cytométrie en flux.....	226
1. Etude de l'apoptose induite par IP2 .....	226
2. Cinétique de retour des molécules H-2K <sup>b</sup> à la surface cellulaire.....	226
3. Analyse de la population T CD8 <sup>+</sup> spécifique du SIINFEKL .....	227
IV – Séquençage de l'ARN (RNA-seq) .....	228
1. Analyse différentielle de l'expression de gènes .....	228
2. Construction des bases de données « Retained Introns ».....	228
V – Analyse de l'immunopeptidome du CMH-I.....	229
1. Préparation des colonnes d'affinité .....	229
2. Elution des peptides présentés dans les molécules du CMH-I.....	229
4. Caractérisation par LC-MS/MS .....	231
5. Analyse quantitative « sans étiquette » .....	231
6. Disponibilité des données.....	232
VI – Tests ELISpot et ELISA .....	232
1. ELISpot IFN <sub>γ</sub> .....	232
2. ELISA IL-2 .....	233
VII – Expérimentation animale .....	233
1. Suivi de croissance tumorale après traitement .....	233
2. Déplétion des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	234
3. Réponse mémoire antitumorale.....	234
4. Transfert adoptif de cellules T CD8 <sup>+</sup> OT-1 .....	234
5. Immunisation avant ELISpot IFN <sub>γ</sub> .....	235
6. Combinaison drogue/peptide – Vaccination prophylactique .....	236
7. Combinaison drogue/peptide – Vaccination thérapeutique .....	236
8. Combinaison vaccin thérapeutique/anti-PD-1 .....	237

Publications et communications.....	238
I – Publications.....	238
II – Communications.....	239
Bibliographie.....	240
Annexe .....	285
1. Article: « Isoginkgetin derivative IP2 enhances the adaptive immune response to tumor antigens ».....	285

## Liste des figures

---

Figure 1: Théories de l'« intimité » et du « soi altéré » (Zinkernagel and Doherty, 1974). ....	19
Figure 2: Structure de la molécule HLA-A2 (Bjorkman et al., 1987). .....	20
Figure 3: Structure d'un dimère HLA-DR1 (Brown et al., 1993). .....	21
Figure 4: Présentation croisée des antigènes par les DCs (Joffre et al., 2012). .....	25
Figure 5: Activation des LT CD4 <sup>+</sup> et LT CD8 <sup>+</sup> par les DCs (Thaiss et al., 2011).....	26
Figure 6: Protéasome 26S (Proteasome Protein Center, proteasome.net).....	28
Figure 7: Recyclage des molécules du CMH-I dans les APCs non professionnelles (Montealegre and van Endert, 2019).....	32
Figure 8: Voie de présentation antigénique par le CMH-I (Neefjes et al., 2011). .....	34
Figure 9: Complexe de pré-initiation de la traduction chez les eucaryotes (adapté de Jackson et al., 2010).....	40
Figure 10: Sources d'antigènes pour la voie de présentation par le CMH-I (adapté de Laumont and Perreault, 2017). .....	41
Figure 11: Organisation de la contexture immunitaire (Fridman et al., 2012).....	51
Figure 12: L'immunoédition tumorale (Schreiber et al., 2011).....	56
Figure 13: Classification des antigènes tumoraux reconnus par des CTLs chez l'homme. (Vigneron, 2015).....	61
Figure 14: Procédures d'identification de neoantigènes (Garcia-Garijo et al., 2019). .....	67
Figure 15: Lymphocytes T modifiés par transfert de gène (Catros, 2019). .....	76
Figure 16: Structure des différentes générations de cellules CAR T (Tokarew et al., 2019). .	77
Figure 17: Rationnel pour la combinaison des inhibiteurs de la voie MAPK et des immunothérapies (Yu et al., 2019).....	88
Figure 18: Structure des composés isoginkgetine et IP2.....	93
Figure 19: Toxicité des composés isoginkgetine et IP2 évaluée par test MTT.....	95
Figure 20: Evaluation de l'apoptose induite par IP2. ....	96
Figure 21: Effet d'IP2 sur les molécules H-2K <sup>b</sup> à la surface des cellules MCA205 et B16F10. ....	98
Figure 22: Effet d'IP2 sur la cinétique de retour des molécules H-2K <sup>b</sup> à la surface des cellules MCA205.....	99
Figure 23: Analyse différentielle de l'expression des gènes après traitement avec IP2.....	100
Figure 24: Analyse différentielle de l'expression des gènes après traitement avec	

l'isoginkgetine.....	102
Figure 25: Evénements d'épissage alternatifs.....	103
Figure 26 : Comparaison de l'effet de l'isoginkgetine et d'IP2 sur l'épissage alternatif.....	104
Figure 27: Effet d'IP2 dans des souris dépourvues de LT CD8 <sup>+</sup> .....	106
Figure 28: Effet d'IP2 sur la prolifération des LT CD8 <sup>+</sup> OT-1. ....	107
Figure 29: Longueur des peptides présentés à la surface cellulaire après traitement avec IP2. .....	110
Figure 30: Variations des peptides H-2K <sup>b</sup> observées sur la base MCA205 « All frame ». ...	112
Figure 31: Variations des peptides H-2K <sup>b</sup> observées sur la base MCA205 « Retained Introns + Uniprot ». ....	113
Figure 32: Variations des peptides H-2D <sup>b</sup> observées sur la base MCA205 « All Frame ». ..	114
Figure 33: Variations des peptides H-2D <sup>b</sup> observées sur la base MCA205 « Retained Introns + Uniprot ». ....	115
Figure 34: Variations des peptides H-2K <sup>b</sup> observées sur la base B16F10 « All Frame ».....	117
Figure 35: Variations des peptides H-2K <sup>b</sup> observées sur la base B16F10 « Retained Introns + Uniprot ». ....	119
Figure 36: Variations des peptides H-2D <sup>b</sup> observées sur la base B16F10 « All Frame ».....	120
Figure 37: Variations des peptides H-2D <sup>b</sup> observées sur la base B16F10 « Retained Introns + Uniprot ». ....	121
Figure 38: Sélection des groupes d'immunisation prometteurs par ELISPOT IFN <sub>γ</sub> .....	128
Figure 39: Déconvolution des groupes d'immunisation par ELISPOT IFN <sub>γ</sub> . ....	129
Figure 40: Déconvolution des groupes d'immunisation par ELISA IL-2. ....	130
Figure 41: Effet prophylactique de la combinaison IP2/peptide sur la croissance des MCA205. .....	132
Figure 42: Effet prophylactique de la combinaison IP2/peptide sur la croissance des B16F10. .....	133
Figure 43: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/peptide sur la croissance des MCA205. .....	134
Figure 44: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/peptide sur la croissance des B16F10. .....	135
Figure 45: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/anti-PD-1 sur la croissance des MCA205 WT.....	137
Figure 46: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/anti-PD-1 sur la croissance des B16F10	

WT.....	138
Figure 47: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/peptide/anti-PD-1 sur les MCA205..	139
Figure 48: Structure protégée des composés à activité duale.....	199
Figure 49: Effet des composés CoSMIT_1, CoSMIT_2 et CoSMIT_3 sur la présentation antigénique. ....	201
Figure 50: Activité antitumorale du composé IP2 et des composés multi-cibles. ....	203
Figure 51: Protection à long terme des souris traitées avec les composés multi-cibles.....	204
Figure 52: Etapes de l'assemblage du splicéosome (adapté de Turunen et al., 2013).....	207
Figure 53: Schéma du montage pour l'immunoprécipitation des peptides du CMH-I.....	230

## Liste des tableaux

---

Tableau 1: Récepteurs de type Toll dans les immunothérapies antitumorales (adapté de Kaczanowska et al., 2013; Khong and Overwijk, 2016).....	81
Tableau 2: Evénements d'épissage alternatif induits par l'isoginkgetine et IP2 dans les cellules MCA205 et B16F10. ....	104
Tableau 3: Liste des néoantigènes induits par IP2 à la surface des MCA205. ....	123
Tableau 4: Liste des néoantigènes induits par IP2 à la surface des B16F10.....	123
Tableau 5: Liste des peptides candidats MCA205.....	125
Tableau 6: Liste des peptides candidats B16F10. ....	126
Tableau 7: Composition des groupes d'immunisation.....	127
Tableau 8: Liste réduite des peptides candidats MCA205 et B16F10. ....	131
Tableau 9: Exemple de préparation des solutions injectables pour l'immunisation.....	235

## Abréviations

---

ACT : Transfert Adoptif de Cellules

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALV : Variant de perte d'antigène

APC : Allophycocyanine

ARN : Acide Ribonucléique

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BMDC : Cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse

CAR : Récepteur antigénique chimérique

cDC : Cellule dendritique conventionnelle

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH-II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CRPC : Cancer de la prostate résistant à la castration

CTL : Lymphocyte T Cytotoxique

DAMP : Motif moléculaire associé aux dégâts

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DC : Cellule dendritique

DFS : Survie sans maladie

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DRiPs : Produits ribosomiques défectueux

EDTA : Acide Ethylènediaminetétraacétique

FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

FPKM : Fragments par kilobase par million

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

i.p. : intrapéritonéal

i.v. : intraveineuse

IFA : Adjuvant incomplet de Freund

IL : Interleukine

LB : Lymphocyte B

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en

tandem

MCA : 3-méthylcholanthrène

MDSC : Cellule myéloïde suppressive

MΦ : Macrophage

NK : Tueuse naturelle

ODN : Oligonucléotides

ORF : Cadre de lecture ouvert

ORR : Taux de réponse objective

OVA : Ovalbumine

pAPC : Cellule présentatrice d'antigènes professionnelle

PBS : Tampon phosphate salin

pCHM-I : peptide du CMH de classe I

pCMH-II : peptide du CMH de classe II

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PE : Phycoérythrine

PFS : Survie sans progression

PLC : Complexe de chargement de peptide

PTPs : Produits de traduction précoce

RFS : Survie sans récurrence

s.c. : sous-cutané

SLP : Peptide synthétique long

SVF : Sérum de Veau Fétal

TAA : Antigène associé à la tumeur

TCR : Récepteur des cellules T

TIL : Lymphocyte T infiltrant la tumeur

TLR : Récepteur de type Toll

TME : Microenvironnement tumoral

Treg : Lymphocyte T régulateur

TSA : Antigène spécifique de la tumeur

UTR : Région non traduite

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

WES : Séquençage de l'exome entier

WT : Sauvage

β<sub>2</sub>m : β2-microglobuline

# Introduction

---

## I – Molécules du Complexe Majeur d’Histocompatibilité (CMH) et présentation antigénique

### 1. Les molécules du CMH de classe I (CMH-I) et du CMH de classe II (CMH-II)

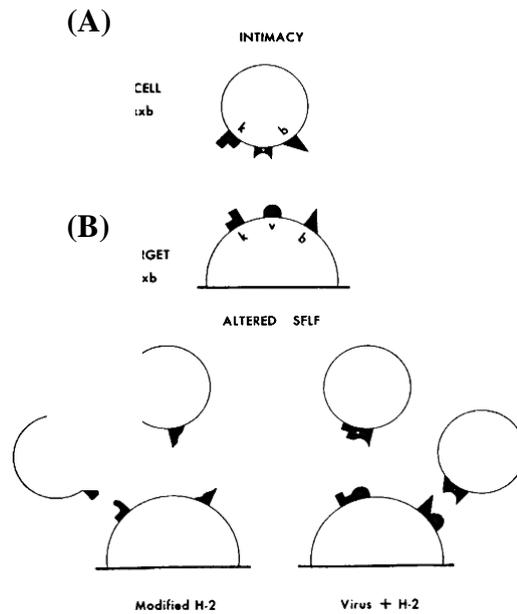
#### 1.1 Histocompatibilité

La notion d’histocompatibilité est née des recherches liées à la transplantation d’organes et à la greffe tissulaire à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle – début du XX<sup>e</sup> siècle. Les premiers travaux sur la transplantation de tumeurs puis sur la transplantation de tissus normaux sur le modèle murin mettent en lumière l’idée d’ « unicité de l’individu » (Medawar, 1957) liée à sa « constitution génétique » (Little and Tyzzer, 1916). Le biologiste américain George Snell publie les « lois de la transplantation » pour expliquer le devenir d’une greffe implantée chez un hôte (Snell et al., 1976). La réussite d’une transplantation est dictée par un déterminisme génétique sous l’influence des « gènes d’histocompatibilité » ou « gènes H » (Snell, 1948). De son côté, l’immunologiste, pathologiste et généticien britannique Peter Gorer décrit l’influence majeure d’un antigène érythrocytaire de la souris, l’antigène II, sur le devenir d’une greffe (Gorer, 1936) Le gène H2 est décrit comme un « système » composé de plusieurs *loci* sur le groupe de linkage IX porté par le chromosome 17. Si d’autres systèmes d’histocompatibilité peuvent dicter le devenir d’une greffe, le système H2 est reconnu comme le « système majeur » car il induit un rejet immédiat des greffons incompatibles. On finit par adopter l’expression « complexe d’histocompatibilité majeur » (CMH) ou « complexe H2 » chez la souris. Le système H2 comprend quatre régions : K, I, S et D. Les antigènes codés par les gènes H-2K et H-2D sont présents et facilement détectables à la surface de toutes les cellules nucléées, ils sont désignés comme les antigènes « classiques » et sont connus comme les molécules du CMH de classe I (CMH-I). La région S contient des gènes codant pour certains facteurs du complément. Dans la région I, les gènes Ia codent pour des antigènes présents uniquement à la surface des lymphocytes B (LB), des lymphocytes T (LT), des macrophages (MΦ), des spermatozoïdes et des cellules épithéliales. Les sous régions A, B, C et E sont ensuite définies et les gènes I-A et I-E sont associés aux molécules du CMH de classe II (CMH-II).

Les premières études d'histocompatibilité chez l'homme ont été menées par le médecin immunologiste et hématologue français Jean Dausset qui décrit les premières réactions de leucoagglutination en analysant les anticorps développés après transfusion. Il découvre que 50% de la population française partage un groupe leucocytaire qui sera dénommé MAC à partir des initiales des trois donneurs du panel étudié (Dausset, 1958). Une collaboration internationale permet de décrire très rapidement le système HLA (*human leukocyte antigen*) équivalent du système H-2 murin. Le complexe HLA comprend quatre *loci* sur le chromosome 6. Les premières régions décrites sérologiquement, HLA-A, HLA-B et HLA-C, sont les molécules du CMH-I humain. Le quatrième locus, HLA-D, se décompose en différentes sous-régions, HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP, désignées comme les molécules du CMH-II humain, équivalents des gènes I-A et I-E murin.

## 1.2 CMH et réaction immunitaire

Les travaux de Karl Landsteiner, à l'origine du système de classification des groupes sanguins ABO, établissent l'importance de l'association d'un haptène avec une molécule support immunogène pour initier une réponse immunitaire. Baruj Benacerraf attribuera cette fonction de molécules supports immunogènes aux molécules codées par les gènes Ia à la surface des macrophages qui portent les antigènes reconnus par les cellules T auxiliaires (Benacerraf, 1981). Rolf Zinkernagel et Peter Doherty observent que les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) isolés de souris immunes pour le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCM) n'attaquent et ne tuent des cellules infectées par le LCM que si ces dernières présentent les mêmes molécules H-2K et H-2D (Zinkernagel and Doherty, 1974a). Ces observations définissent la restriction des différentes classes de LT pour les différents haplotypes du CMH. Zinkernagel et Doherty proposent deux théories pour expliquer ce phénomène : la théorie de « l'intimité » et la théorie du « soi altéré » (**Figure 1**). La première suggère une double reconnaissance par la cellule T du « soi » (un système d'histocompatibilité similaire) et du « non-soi » (l'antigène viral) par des récepteurs différents. La seconde théorie implique que la cellule T reconnaît simultanément les changements induits sur le système H-2 par le virus. La théorie du « soi altéré » est adoptée : les cellules T reconnaissent des antigènes H-2 modifiés ou des complexes anormalement présents à la surface cellulaire (alloréactivité) (Zinkernagel and Doherty, 1975). Le système H-2/HLA joue donc un rôle primordial dans le développement de la réaction immunitaire, pas uniquement dans le cas d'une transplantation.



**Figure 1: Théories de l'« intimité » et du « soi altéré » (Zinkernagel and Doherty, 1974).**

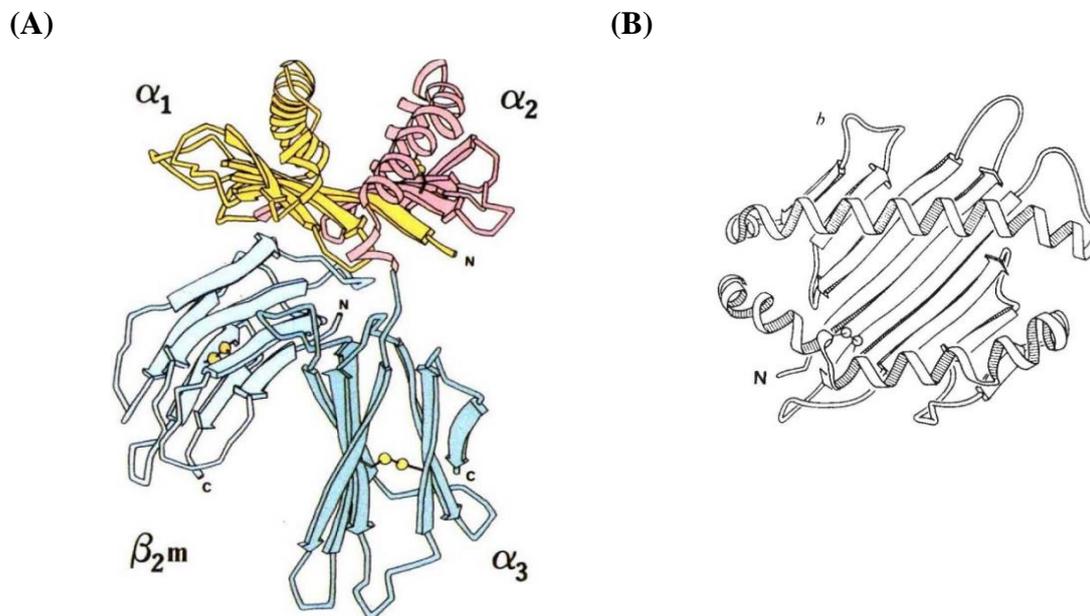
Deux modèles peuvent expliquer que les cellules T ne reconnaissent que les cellules infectées histocompatibles. (A) La théorie de l'« intimité » suggère qu'un même lymphocyte T présente un TCR spécifique d'un antigène viral (v) ainsi qu'un récepteur assurant l'interaction avec chacune des molécules du complexe H-2 ( $H-2^k$  et  $H-2^b$ ). (B) Selon la théorie du soi altéré, le lymphocyte T reconnaît les cibles présentant des molécules H-2 modifiées ou altérées par le virus.

La question s'est alors posée de la nature de ce fragment, de virus dans le cadre d'une infection, qui se retrouve présenté à la surface des cellules infectées dans un complexe avec les molécules H-2 et qui est reconnu de manière spécifique par les LT. A.R.M. Townsend démontre que les CTLs réactifs contre le virus de la grippe reconnaissent spécifiquement des peptides courts (la séquence optimale est ici de quatorze acides aminés) dérivés de la nucléoprotéine virale présentés dans des molécules  $H-2D^b$  à la surface des cellules infectées (Townsend et al., 1986). La caractérisation structurelle des molécules du HLA-A2 humain (Bjorkman et al., 1987) puis du  $H-2K^b$  murin (Zhang et al., 1992) a amélioré la compréhension des interactions entre le peptide antigénique et son support de présentation. Il faudra attendre quelques années pour que soient révélées quasi simultanément les structures des complexes TCR-peptide-CMH murin (Garcia et al., 1996) et humain (Garboczi et al., 1996) permettant d'élucider les mécanismes de reconnaissance du « non soi » par les cellules immunitaires.

On notera que les découvertes majeures mentionnées jusqu'ici ont valu à leurs auteurs d'être récompensés par un prix Nobel de physiologie ou médecine. En 1980, Baruj Benacerraf, Jean Dausset et George Snell reçoivent conjointement le prix Nobel pour « leurs découvertes concernant les structures génétiquement déterminées à la surface des cellules qui régulent les réactions immunologiques ». En 1996, Peter Doherty et Rolf M. Zinkernagel sont récompensés pour « leur découverte concernant la spécificité de la défense immunitaire cellulaire ».

### 1.3 Structures des molécules du CMH

La structure des molécules du CMH-I a été révélée par P.J. Bjorkman en 1987. Les molécules de classe I sont composées de deux chaînes polypeptidiques : une chaîne lourde  $\alpha$  (45kDa) et une chaîne légère  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2m$ ) (12 kDa) (**Figure 2A**). La chaîne lourde  $\alpha$  se compose elle-même de trois domaines extracellulaires ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ), d'une région transmembranaire et d'une extrémité cytoplasmique C-terminale. La chaîne  $\beta_2m$  est liée de manière non covalente au domaine  $\alpha_3$  et n'est pas ancrée dans la membrane.

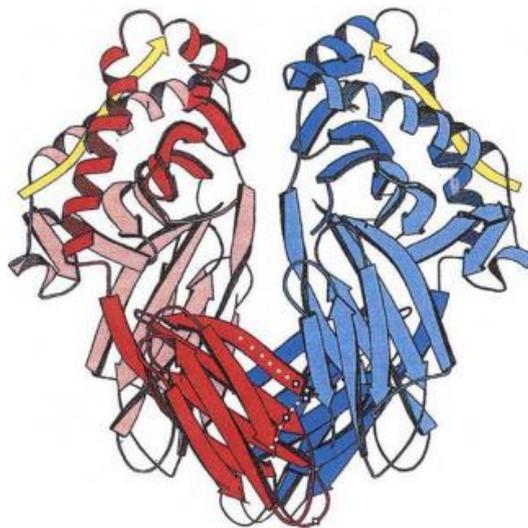


**Figure 2: Structure de la molécule HLA-A2 (Bjorkman et al., 1987).**

(A) Représentation des quatre domaines de la molécule HLA-A2 et (B) vue de dessus du sillon dans lequel se lie le peptide.

Les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , au-dessus des domaines  $\alpha_3$  et  $\beta_2m$ , se disposent en un plancher formé de huit segments en feuillet  $\beta$  et de deux côtés formés d'hélices  $\alpha$  qui créent un sillon décrit comme le site de liaison des peptides du CMH-I (pCMH-I) (**Figure 2B**). Ce sillon mesure 25 Å de long, 10 Å de large et 11 Å de profondeur. Ces dimensions confirment que pour être présenté à la surface cellulaire un antigène doit d'abord être transformé en un peptide de taille plus réduite d'une dizaine d'acides aminés (Shimonkevitz, 1983). Plusieurs équipes ont montré que la taille optimale d'un pCMH-I serait de neuf acides aminés, que les résidus en position P2 et P9 sont les principaux responsables de la liaison du peptide au sillon du HLA-A2 et que ces derniers résidus sont très souvent une leucine et une valine/leucine, respectivement (Falk et al., 1991; Hunt et al., 1992; Parker et al., 1992).

La structure du CMH-II, résolue par J.H. Brown en 1993, est très proche de celle du CMH-I. On distingue deux domaines  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  couplés pour former un plancher à huit segments en feuillet  $\beta$  encadré par deux hélices  $\alpha$ , et deux domaines  $\alpha_2$  et  $\beta_2$ , proches de la membrane. La **Figure 3** représente un dimère formé par deux molécules HLA-DR1 chacune accueillant un peptide dans son sillon.



**Figure 3: Structure d'un dimère HLA-DR1 (Brown et al., 1993).**

Les molécules HLA-DR1 cristallisent en dimères d'hétérodimères  $\alpha\beta$ . Une molécule HLA-DR1 est représentée en rouge, la deuxième est représentée en bleu et les peptides liés sont représentés en jaune. Les chaînes  $\alpha$  sont représentées avec des couleurs claires, les chaînes  $\beta$  sont représentées avec des couleurs plus foncées.

Bien que la structure du CMH-II soit proche de celle du CMH-I, les peptides liés aux molécules de classe II (pCMH-II) ont des caractéristiques différentes. Les extrémités du sillon de la molécule de CMH-II sont ouvertes et ne constituent donc pas des barrières physiques contraignant le peptide à l'intérieur. Les peptides liés aux molécules du CMH-II dépassent généralement hors du sillon et sont plus longs, entre treize et vingt-quatre acides aminés (Rudensky et al., 1991; Chicz et al., 1992). Le sillon du CMH-II est composé de résidus conservés entre les différentes structures qui se lient aux atomes de la chaîne principale du peptide, ainsi que de résidus polymorphiques constituant des poches accommodant plutôt les chaînes latérales des peptides.

La connaissance, d'une part, de la structure des complexes peptide-CMH et, d'autre part, des propriétés physico-chimiques des acides aminés composant le peptide, a permis de développer des algorithmes de prédiction de la liaison entre un peptide et une molécule du CMH. Des réseaux de neurones artificiels permettent de prendre en compte l'énergie de liaison de chaque acide aminé à chaque position de la séquence peptidique tout en considérant que cette énergie peut être influencée par les acides aminés voisins. Ces algorithmes de prédiction tels que le *NetMHCpan4.0* (Jurtz et al., 2017) ou le *MHCflurry* (O'Donnell et al., 2018) sont en constante évolution pour améliorer leur fiabilité. Ils sont largement utilisés dans le cadre du développement de nouvelles immunothérapies pour prédire les épitopes susceptibles d'être présentés à la surface cellulaire et reconnus par un LT.

Les travaux précédemment décrits illustrent l'évolution de nos connaissances sur les molécules du CMH et soulignent leur rôle fondamental. Ces molécules sont intrinsèquement liées à la distinction entre le « soi » et le « non-soi » et à la détection du danger. Le système CMH régit le répertoire des peptides présentés à la surface cellulaire et la réponse cellulaire qui en découle. Dans ce qui suit, nous décrirons les voies de présentation des antigènes dans lesquelles sont impliquées les molécules de présentation du CMH, en portant une attention particulière sur la voie de présentation par le CMH-I, et nous nous intéresserons à l'origine des peptides présentés à la surface cellulaire dans les molécules du CMH-I, à savoir l'immunopeptidome du CMH-I.

## 2. Les voies de présentation des antigènes par les molécules du CMH

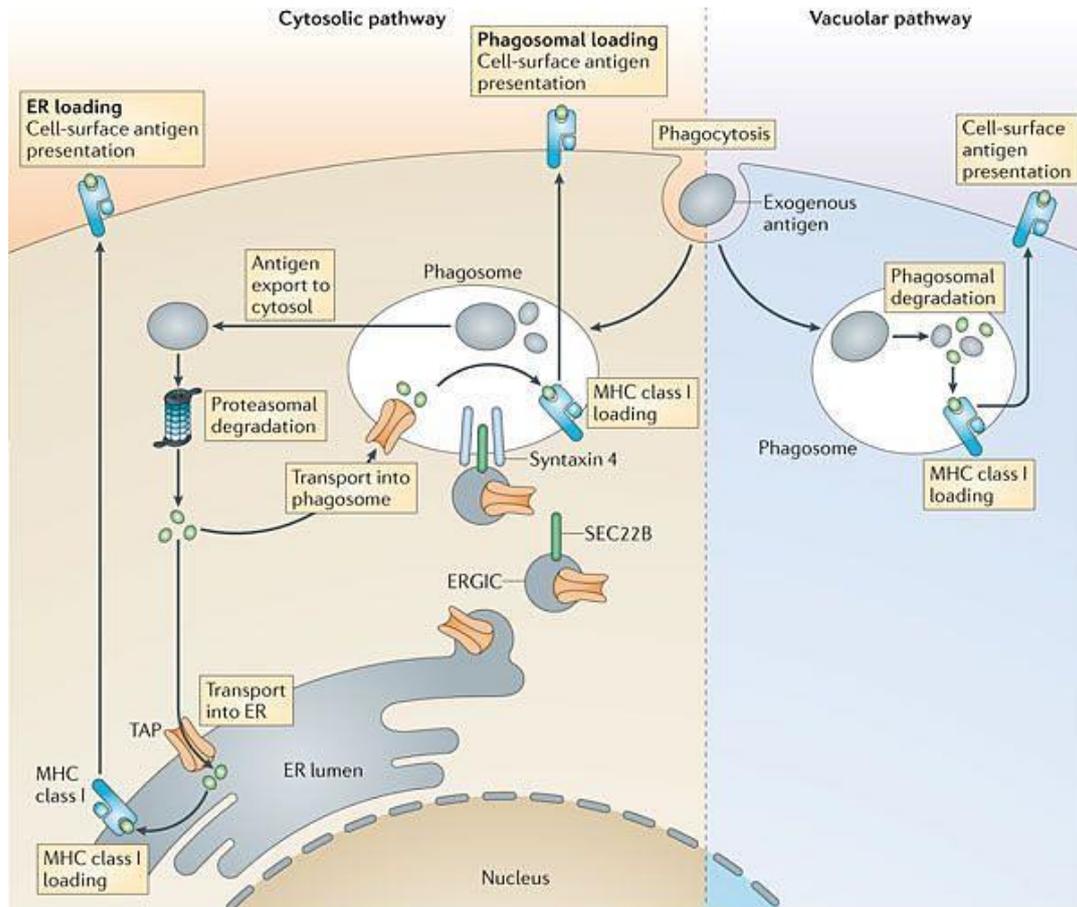
### 2.1 Caractéristiques générales des voies de présentation des antigènes

Les LT, comme les LB, contribuent à l'immunité adaptative (voir 1.1 Lymphocytes). Leur activation s'accompagne d'une expansion clonale et de la mise en place d'une réponse mémoire. Pour cela, le lymphocyte doit d'abord identifier la cellule anormale à éliminer qui représente un danger pour l'organisme. Or, un lymphocyte T n'est pas capable de reconnaître directement une cellule infectée par un virus ou par une bactérie, ou une cellule cancéreuse en mutation. Les voies de présentation des antigènes par les molécules du CMH permettent donc d'afficher à la surface cellulaire des informations sur l'état de la cellule afin d'en informer les différents acteurs de la réponse adaptative.

Toutes les cellules nucléées des vertébrés à mâchoires (Gnathostomes) présentent des antigènes endogènes, synthétisés dans leur propre cytoplasme, aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (LT CD8<sup>+</sup>) dans le contexte de molécules du CMH-I. Ce processus de présentation directe permet aux LT d'identifier les cellules infectées et les cellules cancéreuses. L'expression des molécules du CMH-II est, quant à elle, restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (pAPCs). Les macrophages, les cellules dendritiques (DCs) et les LB internalisent des antigènes exogènes et les présentent à leur surface aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires (LT CD4<sup>+</sup>) dans le contexte des molécules du CMH-II. La voie de présentation antigénique par le CMH-II donne donc aux LT une information sur l'environnement extracellulaire et non sur l'état intracellulaire (Rock et al., 2016). LT CD8<sup>+</sup> et LT CD4<sup>+</sup> sont soumis très tôt à un processus de sélection visant à éliminer les clones auto-réactifs (Sprent and Kishimoto, 2001). Dans le thymus, les thymocytes en développement qui expriment encore à la fois les molécules CD4 et CD8 sont soumis à une première sélection positive. Dans le cortex thymique, seuls les thymocytes dont le TCR est capable de reconnaître les molécules du CMH-I ou du CMH-II présentées par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) survivent. Les thymocytes doubles positifs perdent alors un des deux marqueurs CD4 ou CD8 et entrent en contact dans la partie médullaire du thymus avec des cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs) et des DCs qui présentent des peptides du soi dans le contexte de molécules du CMH-I ou du CMH-II. Les LT dont le TCR a une

forte affinité pour les complexes CMH-peptide du soi sont éliminés ; c'est la sélection négative (Klein et al., 2014). Les voies de présentation des antigènes sont donc primordiales dans la reconnaissance du « soi » et du « non-soi » (Heinen, 2001).

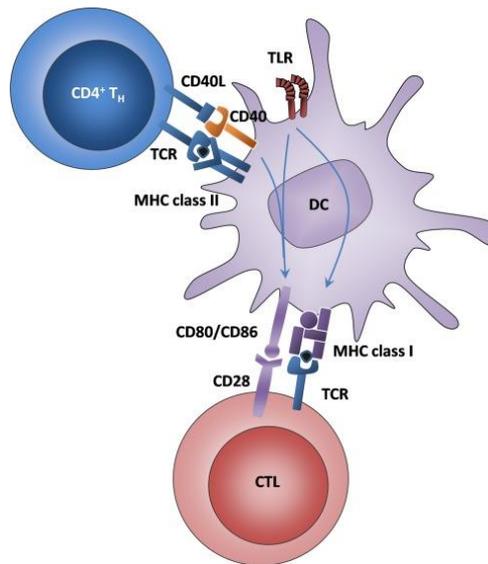
Si la voie de présentation par le CMH-I concerne principalement les antigènes endogènes et la voie de présentation par le CMH-II les antigènes exogènes, il existe des interactions entre ces deux voies qui ne sont pas mutuellement exclusives. La présentation croisée désigne par exemple la présentation de peptides exogènes dans des molécules du CMH-I par les pAPCs. Ce processus fondamental permet d'activer la réponse CD8<sup>+</sup> quand les pAPCs ne sont pas elles-mêmes infectées ou dans le cas d'un cancer. Les pAPCs internalisent les antigènes du milieu extracellulaire par phagocytose ou par endocytose médiée par récepteurs. L'antigène subit alors une transformation et un apprêtement, par voie cytosolique s'il est dégradé par le protéasome dans le cytosol et chargé sur une molécule du CMH-I dans le réticulum endoplasmique, ou par voie vacuolaire si la dégradation et le chargement de l'antigène ont lieu dans le phagosome (**Figure 4**).



**Figure 4: Présentation croisée des antigènes par les DCs (Joffre et al., 2012).**

Dans la voie cytosolique de présentation croisée des antigènes, les antigènes exogènes sont phagocytés puis exportés dans le cytosol où ils sont dégradés par le protéasome. Les produits de dégradation sont ensuite transportés par les transporteurs associés à la présentation antigénique (TAP) vers le réticulum endoplasmique (ER) ou ré-importés dans le phagosome pour être chargés sur des molécules du CMH-I vides. Au niveau d'un compartiment intermédiaire entre l'ER et le Golgi (ERGIC), l'interaction de la protéine SEC22B de la superfamille des protéines SNARE avec la syntaxine 4 induit le recrutement du transporteur TAP au niveau de l'ER. Dans la voie vacuolaire de la présentation croisée des antigènes, les antigènes exogènes sont phagocytés puis dégradés et chargés sur des molécules du CMH-I vides dans le phagosome.

La présentation croisée d'antigènes exogènes par les DCs dans le but d'activer les LT CD8<sup>+</sup> est désignée sous le nom de *cross priming* (**Figure 5**). L'activation des LT par les DCs dans les ganglions requiert trois signaux : (i) la reconnaissance par le TCR du LT de l'antigène présenté dans le contexte d'une molécule du CMH, (ii) l'interaction entre les molécules de co-stimulation exprimées par le LT (CD40L, CD28) et la DC (CD40, CD80/CD86) et (iii) la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN $\alpha$ , IL-12).



**Figure 5: Activation des LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> par les DCs (Thaiss et al., 2011).**

Les LT CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> interagissent avec les DCs via leur TCR qui reconnaît des peptides présentés dans des molécules du CMH-II et au niveau du CD40L qui se fixe sur le récepteur CD40. Les CTLs reconnaissent les peptides présentés dans les molécules du CMH-I et expriment le récepteur CD28 qui reconnaît les ligands CD80/CD86 sur les DCs. La stimulation des TLR de la DC induit l'expression du CMH-I et des ligands CD80/CD86 favorisant ainsi l'interaction DC/CTL.

Par ailleurs, certaines cellules sont reliées entre elles par des jonctions communicantes laissant circuler des petites molécules (ATP, peptides) et des ions (Ca<sup>2+</sup>). Ces peptides exogènes qui ont « fuité » de leur cellule d'origine peuvent alors rejoindre la voie de présentation endogène par le CMH-I dans la cellule voisine (Neijssen et al., 2005). De telles jonctions ont été décrites entre pAPCs et APCs non professionnelles dans les ganglions ainsi qu'entre DCs et cellules tumorales *in vivo* (Saccheri et al., 2010) renforçant l'activation des LT et la réponse antitumorale. Enfin, des antigènes endogènes peuvent à l'inverse être présentés dans des molécules du CMH-II. Des LB et des macrophages présentent par exemple des peptides dérivés de protéines cytosoliques dans des molécules du CMH-II illustrant une tolérance centrale pour des pCMH-II *in vivo* (Dongre et al., 2001). D'autres équipes décrivent la présentation de peptides dérivés de protéines intracellulaires et lysosomales dans des molécules du CMH-II au cours du processus d'autophagie (Dengjel et al., 2005; Crotzer and Blum, 2010) ou au cours de voies non autophagiques telles que la voie « type CMH-I » (impliquant le protéasome et le transporteur associé à la présentation antigénique (TAP)), la voie médiée par la protéine de choc thermique (HSP) 90 ou l'internalisation de protéines de la membrane plasmique (Leung, 2015).

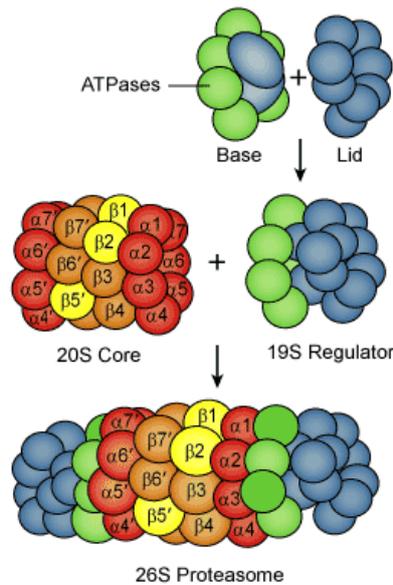
## 2.2 Les étapes de la voie de présentation antigénique par le CMH-I

### ✚ Dégradation de la protéine source dans le cytosol

Nous avons déjà mentionné que pour être présenté à la surface cellulaire un antigène devait atteindre une taille réduite répondant aux contraintes structurelles des molécules du CMH et que la dégradation de la protéine ou du polypeptide source est un prérequis à une présentation antigénique efficace (Shimonkevitz, 1983).

Une protéine anormale, du fait de sa structure, de son origine ou de son activité, va être soumise à un processus de dégradation visant à son élimination. Ce processus débute par le couplage de la protéine à plusieurs molécules d'ubiquitines qui constituent un signal d'adressage de la protéine au protéasome 26S. Le protéasome 26S est un complexe multiprotéique qui dégrade les substrats polyubiquitiniylés en consommant de l'ATP (Bard et al., 2018). Il est composé (i) d'un cœur catalytique 20S en forme de tonneau creux formé par quatre anneaux heptamériques (sept sous-unités  $\alpha$  externes et sept sous-unités  $\beta$  internes) et (ii) de deux complexes régulateurs 19S situés de part et d'autre du cœur catalytique (**Figure 6**).

Le complexe 19S, composé d'une base et d'un « couvercle », régule l'entrée des protéines polyubiquitiniylées dans le cœur catalytique ; il reconnaît et clive les molécules ubiquitines couplées à la protéine. Dans le cœur catalytique, l'anneau  $\alpha$  assure la reconnaissance du substrat et son accès à la chambre catalytique formée par les anneaux  $\beta$ . L'activité catalytique des anneaux  $\beta$  est assurée par les protéases  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  à activités caspase-like (résidus acides), trypsine-like (résidus basiques) et chymotrypsine-like (résidus hydrophobes et aromatiques), respectivement.



**Figure 6: Protéasome 26S (Proteasome Protein Center, proteasome.net).**

Le protéasome 26S est composé de la sous-unité régulatrice 19S et du cœur catalytique 20S. Le cœur catalytique 20S est composé de sous-unités  $\alpha$  qui assurent la reconnaissance du substrat et de sous-unités  $\beta$  qui assurent l'activité catalytique. La particule 19S est composée d'une base dont l'activité est dépendante de l'ATP et d'un couvercle.

D'autres protéasomes existent en plus du protéasome canonique précédemment décrit. La particule de régulation 19S peut être remplacée par une particule PA200 ou par une particule 11S autrement désignée sous le nom de REG ou PA28. La famille PA28 comprend trois activateurs du protéasome :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les sous-unités PA28  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent s'assembler en hétéro-multimères tandis que la sous-unité PA28  $\gamma$  forme des homo-heptamères. Le complexe PA28 $\alpha\beta$  est cytoplasmique, il est retrouvé dans tous les tissus mais particulièrement enrichi dans les tissus immuns. Le complexe stimule les trois activités protéolytiques du 20S et il est inductible par l'IFN $\gamma$  (Tanahashi et al., 1997) ce qui suggère un rôle particulier de ce régulateur dans la présentation antigénique et la réponse immunitaire. En effet, l'expression de PA28 $\alpha\beta$  est associée à une augmentation de la présentation antigénique par le CMH-I (Sijts et al., 2002) et une présentation accrue de peptides courts mais aussi de longs peptides hydrophiles (Raule et al., 2014). PA28 $\gamma$ , quant à lui, a une expression nucléaire et ne stimule que l'activité trypsine-like. De plus, son expression n'est pas régulée par l'IFN $\gamma$  ce qui illustre un rôle à part dans la famille PA28. Il agit notamment sur l'apoptose et la progression dans le cycle cellulaire (Mao et al., 2008). Nous avons récemment montré que la surexpression de PA28 $\gamma$  par les cellules cancéreuses conduisait à une dégradation accrue des peptides

antigéniques avant leur présentation et constituait ainsi un moyen d'échapper à l'immunosurveillance (Boulpicante et al., 2020). Les tissus lymphoïdes et les tissus non-lymphoïdes stimulés par l'IFN $\gamma$  expriment une variante du protéasome 20S désignée sous le nom d'immunoprotéasome (Sijts and Kloetzel, 2011). Les trois protéases  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 5 y sont remplacées par les protéases  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 2i (MECL-1) et  $\beta$ 5i (LMP7) qui possèdent une activité trypsine-like et chymotrypsine-like augmentée. Or, les molécules du CMH-I ont une affinité particulièrement forte pour les peptides avec une extrémité C-terminale basique ou hydrophobe, l'immunoprotéasome joue donc un rôle primordial dans la génération de pCMH-I susceptibles de déclencher une réponse immunitaire (Gaczynska et al., 1993). Cependant, les fonctions de l'immunoprotéasome vont au-delà de son rôle dans la présentation antigénique. Elles incluent la régulation de la polarisation des cellules T et des mécanismes de l'inflammation (Kimura et al., 2015) ainsi que l'élimination des protéines subissant un stress oxydatif (Pickering et al., 2010).

La diversité des voies de dégradation des protéines et leur régulation dans un contexte inflammatoire ou immun contribue à la grande richesse des peptides générés pour la voie de présentation antigénique par le CMH-I. La grande majorité de ces peptides sera néanmoins détruite par des aminopeptidases telles que la tripeptidyl peptidase II (TPPII) pour les peptides longs et la thimet oligopeptidase (TOP) pour les peptides courts et ne se retrouvera jamais à la surface cellulaire. En réalité, on considère que pour dix mille protéines dégradées, un seul peptide sera présenté dans une molécule du CMH-I (Yewdell et al., 2003). Avant de se retrouver à la surface cellulaire, ce peptide tout juste sorti du protéasome doit rejoindre le réticulum endoplasmique où il sera chargé sur une molécule du CMH-I vide.

#### **Apprêtement du peptide dans le réticulum endoplasmique**

Le transfert des peptides dans le réticulum endoplasmique est assuré par les « pompes » TAP composées de deux sous-unités TAP1 et TAP2 nécessaires pour assurer la translocation du peptide en présence d'ATP (Neefjes et al., 1993; Shepherd et al., 1993). Le site de liaison de TAP et du peptide est formé par une association de régions présentes sur TAP1 et sur TAP2 au niveau de la frontière entre la portion transmembranaire et la portion cytosolique (Nijenhuis and Hämmerling, 1996). Plusieurs études ont montré que le résidu C-terminal du peptide dictait l'affinité du peptide pour le site de liaison de TAP et donc la spécificité de la translocation (Neefjes et al., 1995). Chez la souris, TAP fixe préférentiellement les peptides de huit à seize acides aminés avec une extrémité C-terminale hydrophobe alors que chez

l'homme cette extrémité C-terminale est préférentiellement basique. Afin de répondre aux contraintes structurelles imposées par la taille du sillon de liaison des molécules du CMH-I, le peptide peut être soumis à un traitement consécutif par les aminopeptidases ERAP1 et ERAP2 qui lui assurent une taille optimale (Hammer et al., 2007). Dans le réticulum endoplasmique, le transporteur TAP est physiquement associé aux molécules du CMH-I vide (Ortmann et al., 1994; Suh et al., 1994) et il apparaît que cette interaction est permise par une molécule chaperonne intermédiaire, la tapasine, qui assiste l'assemblage du complexe peptide-CMH (Sadasivan et al., 1996). Les molécules TAP, la tapasine et la molécule du CMH-I font partie d'un complexe plus large appelé complexe de chargement de peptide ou *peptide loading complex* (PLC) comprenant également les molécules chaperonnes calnexine et calréticuline qui assurent le maintien de la conformation repliée du CMH-I, ainsi que la molécule chaperonne Erp57 qui intervient dans la rupture et la reformation de la liaison disulfure du domaine  $\alpha 2$  de la molécule du CMH-I (Blees et al., 2017). Dans ce complexe, la tapasine joue un rôle primordial car, en son absence, la liaison des autres molécules chaperonnes avec la molécule du CMH-I est compromise. Les cellules déficientes pour la tapasine montrent un nombre réduit de molécules du CMH-I à leur surface, des molécules du CMH-I chargées avec des peptides de moindre affinité et une présentation antigénique aux LT globalement moins efficace (Garbi et al., 2000; Grandea III et al., 2000). La tapasine semble particulièrement impliquée dans la séquestration de la molécule du CMH-I vide dans le réticulum endoplasmique tant que celle-ci n'a pas été chargée avec un peptide ayant une bonne affinité. La plupart des peptides importés dans le réticulum endoplasmique par les molécules TAP ne forment donc pas *in fine* un complexe avec une molécule du CMH-I soit parce que leurs caractéristiques physico-chimiques ne le permettent pas, soit parce qu'un peptide de meilleure affinité prend leur place dans le sillon du CMH-I (Grandeia and Van Kaer, 2001). Ces peptides qui échouent à former un complexe stable avec une molécule du CMH-I entrent dans la voie de dégradation ERAD qui conduit à leur destruction dans le cytoplasme ou à leur recyclage et à leur nouvelle entrée dans le réticulum endoplasmique au niveau des molécules TAP (Roelse et al., 1994). La molécule du CMH-I qui a lié un peptide avec une bonne affinité est libérée du PLC et peut quitter le réticulum endoplasmique.

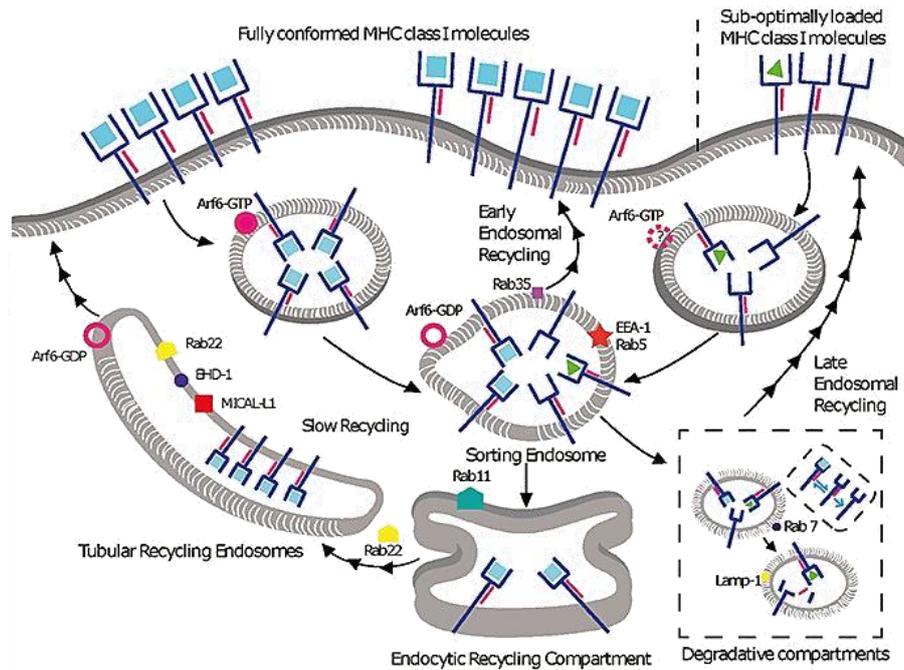
#### **Adressage du complexe peptide-CMH à la membrane cellulaire**

Les mécanismes d'export des complexes peptide-CMH-I du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi puis la membrane cellulaire font l'objet de débats. E. Spiliotis *et al.* montrent chez la souris que l'export des complexes peptide-CMH-I n'est pas limité par la

dissociation de la molécule TAP et que les complexes s'accumulent au niveau des sites de formation des vésicules de transport recouvertes de COPII. Ils suggèrent également que l'association aux vésicules de transport n'est pas induite par un motif présent sur la queue cytoplasmique des molécules du CMH-I mais que ces dernières interagissent avec des récepteurs de transport tels que BAP31 qui contient un motif KKXX d'adressage au Golgi (Spiliotis et al., 2000). Chez l'homme, l'export des complexes peptide-CMH-I est aussi assuré par des vésicules de transport COPII (Garstka et al., 2007). En revanche, si le rôle de BAP31 n'est pas exclu, des équipes montrent qu'une valine ou une alanine en position C-terminale de la molécule du CMH-I régule son export du réticulum endoplasmique en interagissant avec le complexe Sec23/24, une sous-unité de COPII (Boyle et al., 2006; Cho et al., 2011). Un tel signal d'export venant s'ajouter à celui de BAP31 pourrait permettre à la cellule de s'adapter rapidement à des situations de danger, telles qu'une infection virale, où la présentation d'un grand nombre d'antigènes viraux à la surface permet une réponse immunitaire immédiate. Le Golgi constitue, après le réticulum endoplasmique, un autre point de contrôle qualité pour le complexe peptide-CMH-I. L'observation de molécules du CMH-I dans le Golgi dans des cellules déficientes pour la molécule TAP suggère que des molécules du CMH-I peuvent quitter le réticulum endoplasmique vides ou chargées d'un peptide avec une affinité suboptimale (Baas et al., 1992; Garstka et al., 2007). En définitive, il existe un échange continu entre le réticulum endoplasmique et le Golgi reposant sur des signaux d'adressage et de rétention permettant le recyclage des complexes les moins stables et l'optimisation de la présentation à la surface cellulaire (Hsu et al., 1991).

#### **Recyclage des molécules du CMH-I à la surface cellulaire**

La durée de vie d'un complexe peptide-CMH-I à la surface cellulaire dépend de l'affinité du peptide pour la molécule du CMH-I (Howarth et al., 2004) et de la force d'association de la chaîne  $\beta_2m$  qui, tant qu'elle est présente, protège le complexe de la dégradation (Montealegre et al., 2015). Néanmoins, tous les complexes peptide-CMH-I sont soumis à un processus de recyclage dont les mécanismes diffèrent en fonction de la stabilité du complexe initial (**Figure 7**).



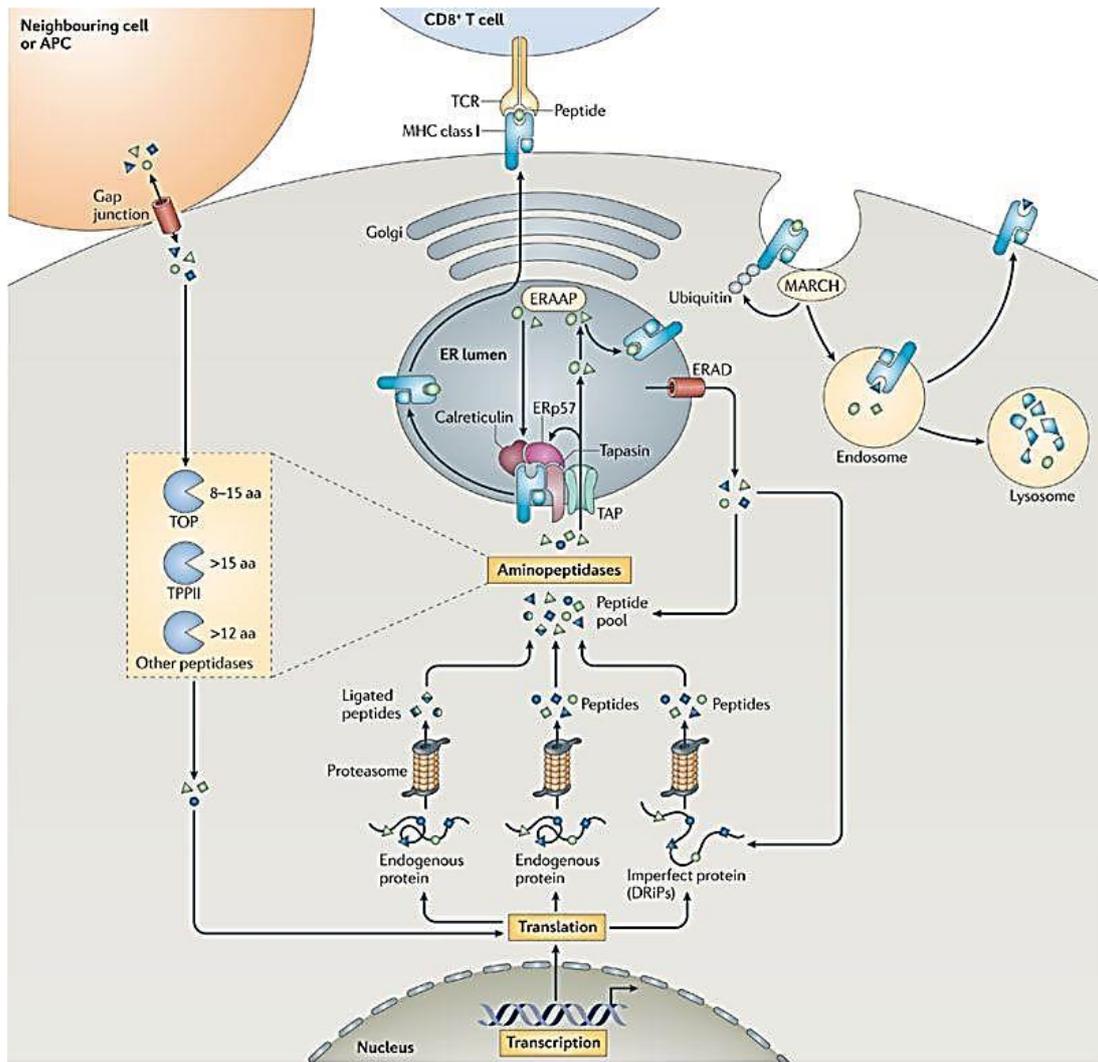
**Figure 7: Recyclage des molécules du CMH-I dans les APCs non professionnelles (Montealegre and van Endert, 2019).**

Les molécules de CMH-I suivent des voies de recyclage différentes en fonction de l'affinité du complexe peptide-CMH-I. Les complexes les plus stables sont internalisés dans des vésicules décorées par l'Arf6 lié au GTP et sont acheminés vers les endosomes de tri EEA1<sup>+</sup>/Rab5<sup>+</sup>. Ils peuvent alors suivre une voie de recyclage rapide régulée par Rab35 ou entrer dans une voie de recyclage lent débutant dans le compartiment endocytique de recyclage (ERC). Le recyclage se poursuit dans les endosomes tubulaires formés par les protéines MICAL-L1, EHD-1, Rab8, Rab22 et Arf6. Les molécules du CMH-I sont ensuite adressées à la membrane dans des vésicules qui fusionnent à la membrane avec l'aide d'Arf6. Les complexes les moins stables rejoignent les endosomes de tri EEA1<sup>+</sup>/Rab5<sup>+</sup> puis sont dissociés dans des compartiments de dégradation. Une partie des complexes les moins stables peut cependant être recyclée à la surface cellulaire.

Les complexes les plus stables sont internalisés par endocytose indépendante de la clathrine dans des vésicules recouvertes par la GTPase Arf6 (Radhakrishna and Donaldson, 1997) et rejoignent des endosomes de tri caractérisés par leur pH acide (6,3 à 6,8) et l'expression de la GTPase Rab5 et de son effecteur EEA-1. A partir de là, les complexes peuvent suivre une voie de recyclage rapide (5-10min) régulée par la GTPase Rab35 dans les endosomes de tri (Allaire et al., 2010) ou une voie de recyclage impliquant le compartiment endocytique de recyclage (ERC) et des endosomes de recyclage tubulaires. Cette dernière voie est régulée par la GTPase Rab22 (Weigert et al., 2004). Les molécules de classe I sont détectées dans les

endosomes de recyclage tubulaires dix minutes après internalisation et trente minutes après internalisation 30% des molécules sont déjà recyclées à la surface cellulaire. Les molécules de CMH-I vides ou chargées avec un peptide de faible affinité sont également internalisées et rejoignent les endosomes de tri Rab5+/EEA1+ mais l'implication de la GTPase Arf6 dans ce processus n'est pas claire (Mahmutefendić et al., 2017). Elles sont ensuite envoyées dans des compartiments de dégradation où la chaîne  $\beta_2m$  est dissociée de la chaîne lourde.

La **Figure 8** ci-après résume les différentes étapes de la voie de présentation antigénique par le CMH-I précédemment détaillées. Si le schéma général implique une fragmentation de la protéine ou du polypeptide source dans le cytosol, un apprêtement du peptide dans le réticulum endoplasmique et un export du complexe peptide-CMH-I à la surface cellulaire en passant par le Golgi, il existe une multitude de mécanismes conduisant à la production et à la sélection des peptides qui iront jusqu'au bout du processus. Une altération d'un seul composant de cette machinerie, très souvent la molécule de CMH-I elle-même ou la molécule TAP, nuit à la génération des complexes immunogènes reconnus par les LT CD8<sup>+</sup> et est souvent associée à des pathologies, notamment la progression des cancers (Leone et al., 2013). Pourtant, des voies de présentation des antigènes alternatives viennent enrichir la voie principale décrite jusqu'ici et peuvent pallier à des défauts dans l'activité protéasomale ou dans l'activité du transporteur TAP (Oliveira and van Hall, 2015). La contribution de ces mécanismes alternatifs reste encore à mesurer mais ils pourraient jouer un rôle majeur dans l'immunosurveillance des cellules en état de stress induit par une infection virale ou bactérienne. Dans la partie suivante, nous discuterons des sources d'antigènes pour la voie de présentation par le CMH-I et établirons que la richesse de l'immunopeptidome du CMH-I résulte de la grande diversité de ces sources.



**Figure 8: Voie de présentation antigénique par le CMH-I (Neefjes et al., 2011).**

APC : Cellule présentatrice d'antigène ; DRiPs : Produits ribosomiques défectueux ; ER : Réticulum endoplasmique ; ERAAP : Aminopeptidase du réticulum endoplasmique associée à la présentation antigénique ; ERAD : Dégradation associée au réticulum endoplasmique ; TAP : Transporteur associé à la présentation antigénique, TOP : Thimet oligopeptidase ; TPPII : Tripeptidyl peptidase II.

### 3. Sources des antigènes pour la voie de présentation par le CMH-I

#### 3.1 Deux modèles complémentaires

Nous avons décrit la dégradation de la protéine ou du polypeptide dans le cytosol comme la première étape de la voie de présentation antigénique par le CMH-I. La question se pose depuis les années 1990 de savoir quelle(s) est (sont) la (les) source(s) de ces polypeptides pour la génération de pCMH-I. Deux hypothèses majeures ont été avancées et il est important de préciser d'ores et déjà qu'elles ne sont pas mutuellement exclusives. Nous détaillerons dans ce qui suit les concepts de protéines « retraitées » ou *retirees* défendu notamment par Kenneth L. Rock et Alfred L. Goldberg et de *Defective Ribosomal Products* (DRiPs), des produits de traductions défectueuses rapidement dégradés décrits par Jonathan W. Yewdell, Luis C. Antón et Jack R. Bennink.

Les premières études pointent le lien direct entre dégradation protéasomale et présentation antigénique et suggèrent que la source principale de pCMH-I se trouve dans le réservoir de protéines matures en fin de vie, les *retirees*, dans le cadre du processus de renouvellement permanent du protéome cellulaire. M.T. Michalek *et al.* ont démontré l'importance de l'ubiquitination dans l'initiation de la dégradation protéasomale en utilisant des lignées où la conjugaison des molécules d'ubiquitine peut être thermorégulée. Dans des conditions de température inhibant l'ubiquitination, le peptide SIINFEKL dérivé de la protéine ovalbumine (OVA<sub>257-264</sub>) n'est pas présenté par le CMH-I à partir de la protéine introduite dans le cytosol alors qu'il l'est quand le peptide lui-même est directement introduit dans le cytosol (Michalek *et al.*, 1993). L'équipe montre également qu'une modification de la structure de la protéine empêchant son ubiquitination inhibe sa présentation par la voie du CMH-I (Michalek *et al.*, 1996). Par ailleurs, il est possible d'accélérer l'ubiquitination d'une protéine en modifiant son extrémité N-terminale (Varshavsky, 1992). Plusieurs études confirment l'importance du système ubiquitine-protéasome (UPS) dans la génération de pCMH-I en montrant que la déstabilisation d'une protéine par un acide aminé volumineux et chargé en extrémité N-terminale augmente son ubiquitination ainsi que sa présentation et induit une meilleure réponse immunitaire (voir synthèse par Rock and Goldberg, 1999). La découverte et l'utilisation des inhibiteurs du protéasome a permis d'étayer ces résultats. En effet, les

peptides aldéhydes LLnL et MG115 inhibent l'hydrolyse par le 26S des protéines ubiquitinées et la présentation de l'épitope SIINFEKL dérivé de la protéine ovalbumine mais n'affectent pas la présentation du peptide SIINFEKL synthétique ou exprimé à partir d'un minigène (Rock et al., 1994). Des observations similaires ont été faites sur le même modèle avec les lactacystin- $\beta$ -lactones, une autre classe d'inhibiteurs du protéasome (Craiu et al., 1997) permettant de conclure que la dégradation protéasomale du réservoir de protéines cellulaires constituait une source majeure de peptides pour la voie de présentation antigénique par le CMH-I.

Cependant, ce postulat s'est heurté à des observations contradictoires, notamment dans l'étude de la présentation antigénique après infection virale. Pour expliquer que des cellules infectées par le virus de la stomatite vésiculaire ou le virus de la grippe soient reconnues en moins d'une heure par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques alors que la demi-vie de la protéine virale est de l'ordre d'une journée (Esquivel et al., 1992), le groupe de Jack R. Bennink propose que les DRiPs sont la source majeure de pCMH-I (Yewdell et al., 1996). Les DRiPs sont alors définis comme des produits de traductions défectueuses, inhérents au caractère imparfait de tout processus biologique, rapidement adressés au protéasome pour leur dégradation. Cette définition inclut tout d'abord les produits de terminaison précoce (tDRiPs) et les protéines avec une mauvaise conformation (mDRiPs) et offre aux cellules en danger un moyen rapide et efficace du point de vue énergétique de se faire connaître du système immunitaire. Comme l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome avait mis en évidence le lien entre dégradation de la protéine et présentation antigénique, l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des protéines a permis de lier l'efficacité de la traduction à la génération de pCMH-I. Plusieurs équipes montrent que le cycloheximide, un inhibiteur des phases d'initiation et d'élongation dans la synthèse protéique, ralentit l'export des complexes antigéniques du réticulum endoplasmique et que les substrats du protéasome et des transporteurs TAP sont majoritairement des protéines avec une durée de vie très courte de l'ordre de dix minutes (Reits et al., 2000; Schubert et al., 2000). Les DRiPs sont classés dans la famille des polypeptides rapidement dégradés (RDPs) par opposition aux polypeptides dégradés lentement (SDPs) dont la demi-vie s'étale entre quelques heures et plusieurs semaines avec une moyenne d'un à deux jours. En 2014, L.C. Antón et J.W. Yewdell élargissent la définition originale des DRiPs de 1996 pour y inclure les produits « d'ARNm défectueux, du décalage du cadre de lecture, du décalage de l'initiation de la traduction et plus généralement de toutes les erreurs rencontrées au cours du

processus de traduction des ARNm » (Antón and Yewdell, 2014). L'élargissement de cette définition est supporté par le groupe de R. Fåhræus qui, en étudiant les mécanismes déployés par le virus Epstein-Barr pour échapper à l'immunosurveillance, montre que l'inhibition de la dégradation protéasomale de la protéine virale EBNA1 ne suffit pas à inhiber sa présentation contrairement à l'inhibition de la traduction de l'ARNm, ici via le motif Gly-Ala, qui, elle, est à la fois nécessaire et suffisante (Yin et al., 2003; Apcher et al., 2010). Ces résultats pointent le rôle de l'ARNm et non de la protéine mature dans la génération de pCMH-I. Plus tard, l'équipe précise que c'est au niveau de l'initiation de la traduction des ARNm que se joue la production d'une source majeure de pCMH-I, les *Pioneer Translation Products* ou PTPs. S. Apcher *et al.* décrivent un événement de traduction non-canonique générant des peptides antigéniques concomitant avec le contrôle qualité des ARNm avant leur traduction et qui précède donc la dégradation des ARNm non-sens (NMD) (Apcher et al., 2011). La protéine eIF4G, mais pas la protéine « classique » de liaison à la coiffe 5' des ARNm eIF4E, composante du complexe d'initiation eIF4F (voir **Figure 9**), est requise pour la production des PTPs via ce mécanisme. Cette observation amène à dissocier spatialement et temporellement l'événement de traduction conduisant à la synthèse d'une protéine complète fonctionnelle de l'événement de traduction conduisant à la synthèse de pCMH-I.

La question qui intéresse désormais les chercheurs du domaine n'est pas tant de savoir si les DRiPs existent ou si la dégradation des *retirees* peut générer des pCMH-I car comme indiqué précédemment ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs. Dès lors, on cherche plutôt à évaluer le poids de chacune des sources dans la formation de l'immunopeptidome du CMH-I. Les intéines sont des segments de protéine capables de s'auto-exciser quand la protéine est dans une conformation stable. D.J. Farfán-Arribas *et al.* étudient la présentation d'épitopes à cheval sur les extrémités des intéines et montrent que l'« épissage » des intéines permet la présentation de ces épitopes (Farfán-Arribas et al., 2012). Ils observent que cet événement post-traductionnel à partir de protéines matures et fonctionnelles, suivi d'une dégradation protéasomale, est aussi efficace pour générer des pCMH-I que la traduction des DRiPs. D'autres critiques du modèle des DRiPs seront émises par les mêmes auteurs (Rock et al., 2014). Le développement de la protéomique quantitative basée sur la spectrométrie de masse a permis d'apporter des réponses au débat. L'utilisation de la méthode SILAC (*Stable isotope labelling by amino acids in cell culture*) a permis de montrer une faible corrélation entre le niveau de présentation d'un peptide et l'abondance de la protéine dont il est dérivé

(Milner et al., 2006). En outre, E. Milner *et al.* nous invitent à modérer la contribution de la dégradation protéasomale dans la génération de pCMH-I au regard de l'absence d'effet des inhibiteurs du protéasome époxomycine et bortezomib sur la présentation de certains peptides par le CMH-I (Milner et al., 2013). Par ailleurs, des études de protéogénomique réalisées sur des thymocytes murins (Fortier et al., 2008) ou des LB de patients (Granados et al., 2012) démontrent que les transcrits générant des pCMH-I sont plus abondants que les transcrits n'en générant pas. Ces résultats confirment une corrélation entre la présentation d'un antigène et le taux d'expression de l'ARNm source et non pas de la protéine source.

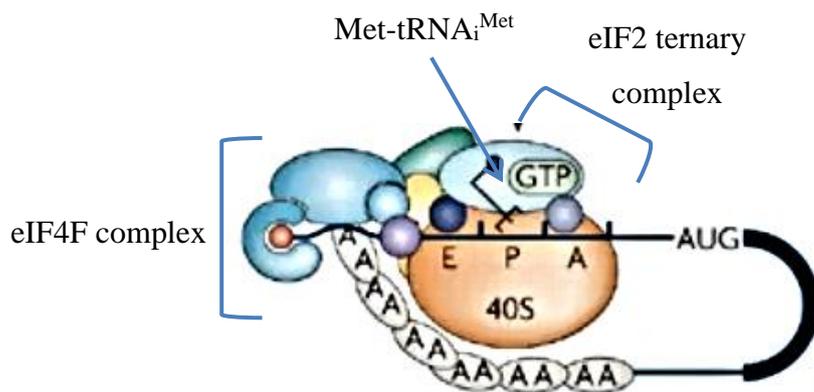
Nous avons discuté jusqu'ici de deux modèles de génération de pCMH-I à partir des séquences codantes du génome traduites dans un cadre de lecture ouvert canonique. Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué avec la définition élargie des DRiPs, des voies de traductions non-canoniques génèrent également des pCMH-I qui sont alors qualifiés de « cryptiques ».

### 3.2 Voies de traductions non-canoniques

Dès la fin des années 1980, T.Boon observe que des cellules transfectées avec des fragments d'ADN tumoral ne possédant aucune séquence promotrice pour favoriser la traduction ou contenant un décalage du cadre de lecture ou un codon stop en amont de la séquence codant pour l'antigène pouvaient quand même être reconnues par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des antigènes tumoraux (Boon and Van Pel, 1989). Il propose alors que les pCMH-I dérivent de « régions courtes du génome situées autour de la séquence de l'antigène et pouvant être traduites de manière autonome » c'est-à-dire indépendamment de la production de l'ARNm et de la protéine correspondants. Ces régions baptisées « peptons » sont à l'origine du concept des DRiPs et posent les fondements du concept de traductions non-canoniques.

Par la suite, les études montrent qu'un décalage du cadre de lecture peut conduire à la production de pCMH-I dits cryptiques. Cette observation est partagée par J.V. Fetteen *et al.* (Fetteen et al., 1991) et N. Shastri et F. Gonzalez (Shastri and Gonzalez, 1993) qui montrent que l'introduction d'une mutation avec décalage du cadre de lecture ne perturbe pas la production des antigènes de la nucléoprotéine du virus de la grippe ou de l'épitope SIINFEKL, respectivement, et que ces antigènes sont reconnus par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques.

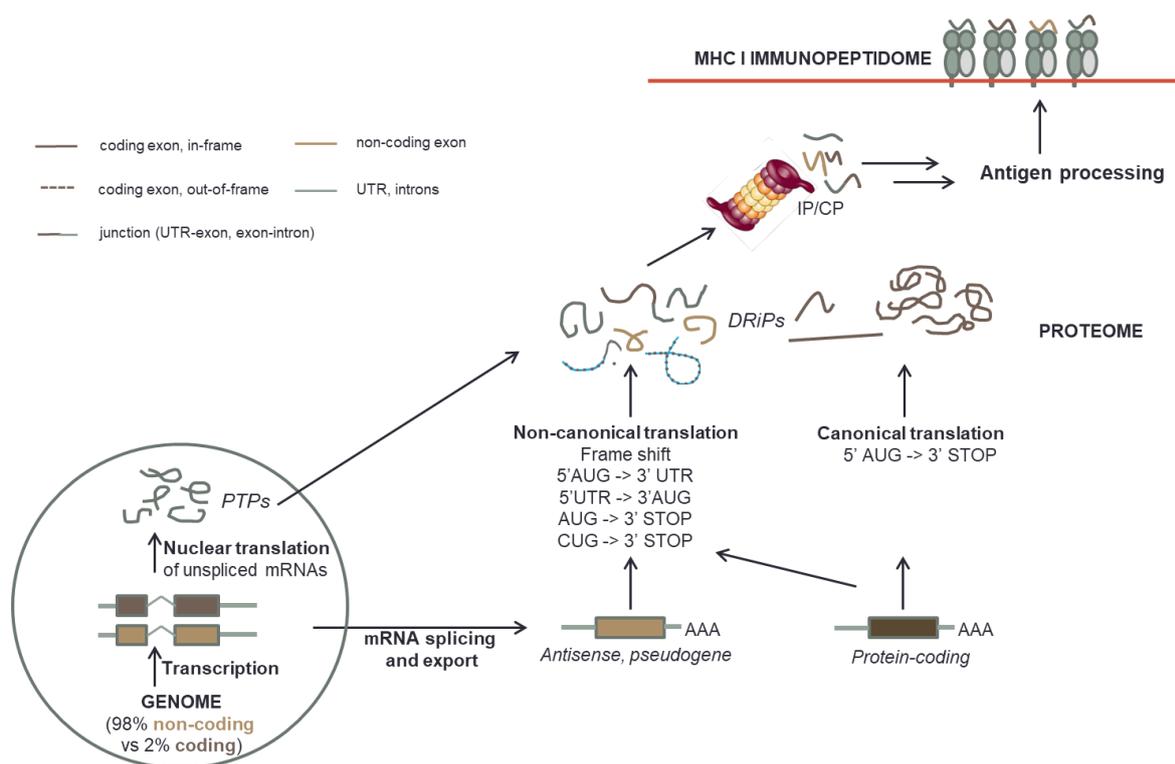
Un décalage du cadre de lecture peut être induit par des anomalies diverses au cours du processus de traduction. Chez les eucaryotes, la traduction se divise en trois phases : initiation, élongation et terminaison. La phase d'initiation débute par la formation du complexe de pré-initiation 43S composé d'une sous-unité ribosomale 40S et du complexe ternaire eIF2 dans lequel le facteur d'initiation de la traduction eucaryotique (eIF) 2 lie l'initiateur Met-tRNA<sup>Met</sup> et le GTP (**Figure 9**). Le complexe 43S, avec l'aide du facteur d'initiation eIF4F et de la protéine de liaison à la queue poly(A), se lie à la coiffe 5' de l'ARNm et commence à parcourir la séquence à la recherche du codon d'initiation AUG inclus dans la séquence de Kozak GCC(A/G)CCAAUGG. Une des voies de traduction non-canonique les plus étudiées est la traduction initiée au niveau d'un codon différent d'AUG mais de séquence proche tels que, dans l'ordre d'efficacité, le CUG, le GUG, l'ACG ou l'AUU (Kearse and Wilusz, 2017). A. Malarkannan *et al.* sont les premiers à décrire la production de peptides antigéniques par un événement de traduction initié au niveau d'un codon CUG et précisent que ce nouveau codon d'initiation est traduit en leucine et non en méthionine comme le codon AUG canonique (Malarkannan et al., 1999). La même équipe démontre que la traduction initiée au niveau d'un codon CUG ne dépend pas du facteur d'initiation eIF2 et implique des ribosomes spécifiques (Schwab et al., 2004). Dans ce contexte, la cellule utilise un initiateur Leu-tRNA qui requiert l'expression du facteur d'initiation eIF2A (Starck et al., 2012). Par ailleurs, la présence d'un codon d'initiation dans l'extrémité 5'-UTR de l'ARNm peut également conduire à la traduction d'un nouveau cadre de lecture ouvert en amont de la séquence codante (uORF), événement impliqué dans la régulation de l'expression des protéines (Calvo et al., 2009). Les initiations non canoniques de la traduction indépendantes du facteur eIF2 jouent un rôle majeur dans les situations de stress cellulaire car elles ne sont justement pas affectées par la réponse intégrée au stress (ISR) contrairement aux initiations canoniques qui sont inhibées par l'ISR. Elles permettent donc d'assurer la traduction de certains transcrits dans ces situations. Enfin, si le ribosome manque le premier codon AUG et initie la traduction au niveau d'un codon AUG en aval, on assiste à un décalage du cadre de lecture qui peut conduire à la production d'épitopes cryptiques (Bullock and Eisenlohr, 1996).



**Figure 9: Complexe de pré-initiation de la traduction chez les eucaryotes (adapté de Jackson et al., 2010).**

Le complexe 43S de pré-initiation de la traduction est composé d'une sous-unité ribosomale 40S, du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> et d'autres facteurs d'initiation de la traduction (eIF). Il parcourt l'ARNm à la recherche d'un codon d'initiation AUG. Le complexe eIF4F assure la fixation du complexe de pré-initiation 43S à l'extrémité 5' de l'ARNm.

Durant la phase d'élongation, le ribosome se déplace le long de l'ARNm et procède à la traduction des nucléotides codon par codon. Cependant, il peut arriver qu'après avoir traduit un codon le ribosome ne se fixe pas sur les trois nucléotides suivants mais « glisse » uniquement d'un seul nucléotide (Namy et al., 2006). Ce phénomène qualifié de décalage de phase de lecture programmé (PRF) est très développé chez les virus. X. Saulquin *et al.* décrivent par exemple, chez un patient atteint du syndrome de Reiter, un épitope de l'IL-10 généré après PRF à partir d'une séquence à cheval entre l'ORF1 et l'ORF2 et reconnu par un clone T CD8<sup>+</sup> (Saulquin et al., 2002). La terminaison de la traduction implique la reconnaissance par le ribosome d'un codon stop qui peut être un UAA, un UAG ou un UGA. De la même façon que le ribosome peut manquer le premier codon d'initiation, il peut manquer le premier codon stop dans l'ORF et donc poursuivre la traduction dans la portion 3'-UTR jusqu'à rencontrer un autre codon stop. Ce mécanisme est à l'origine de la version étendue en C-term du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-Ax) qui possède des propriétés anti-angiogéniques alors que la version canonique du VEGF-A montre une activité pro-angiogénique (Eswarappa et al., 2014). Néanmoins, la terminaison de la traduction au niveau d'un codon stop secondaire est une source mineure de pCMH-I comparée à la traduction initiée au niveau d'un codon d'initiation secondaire (Bullock et al., 1997).



**Figure 10: Sources d'antigènes pour la voie de présentation par le CMH-I (adapté de Laumont and Perreault, 2017).**

CP : Protésome constitutif ; DRiPs : Produits ribosomiques défectueux ; IP : Immunoprotéasome ; MHC : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; PTPs : Produits de traduction précoce ; UTR : région non traduite.

Toutes ces irrégularités dans le processus de traduction pouvant donner naissance à des pCMH-I ont très bien été résumées par C.M Laumont et C.Perrault (Laumont and Perreault, 2017). Cette équipe canadienne a permis une grande avancée dans le domaine en partageant en 2016 les résultats d'une vaste étude de protéogénomique réalisée sur des lignées cellulaires lymphoblastoïdes B (B-LCL) visant à quantifier la proportion de pCMH-I dérivés de traductions non-canoniques. Ces résultats montrent que les pCMH-I cryptiques représentent près de 10% de l'immunopeptidome du CMH-I et qu'ils dérivent de séquences exoniques traduites dans un ORF alternatif, de séquences introniques, intergéniques, 5'-UTR et 3'-UTR et de jonctions UTR-exon ou intron-exon (Laumont et al., 2016) (**Figure 10**). Nous reviendrons sur la stratégie expérimentale déployée dans cette étude dans la suite de ce manuscrit.

### 3.3 Compartimentation de la traduction et sélection préférentielle des pCMH-I

En proposant l'existence des peptons en 1989, T. Boon cherche à expliquer l'efficacité de l'immunosurveillance antitumorale et fait la remarque que « si les peptides antigéniques étaient produits par dégradation des protéines cellulaires, les molécules de classe I seraient toutes occupées par les produits de dégradation de protéines abondamment synthétisées au détriment de protéines faiblement synthétisées » (Boon and Van Pel, 1989). Les peptons qui sont exprimés uniformément sur le génome permettent une représentation de tous les gènes, indépendamment de leur transcription et de leur traduction consécutives, et leur expression rapide dans les situations où cela est nécessaire. Des études de protéomiques ont confirmé que même si douze protéines constituaient à elles seules un quart du protéome (Hukelmann et al., 2016), ces dernières n'étaient pas sur-représentées dans l'immunopeptidome du CMH-I (Milner et al., 2006; Granados et al., 2015). Ces observations incitent à dissocier protéome et immunopeptidome et à envisager des mécanismes dédiés à la production ou à la sélection préférentielle des pCMH-I.

Pour assurer la traduction et la présentation rapide des antigènes viraux, J.W. Yewdell propose l'existence de ribosomes spécialisés dans la production des DRiPs (Yewdell and Nicchitta, 2006). Ces ribosomes baptisés « immunoribosomes » en référence à l'immunoprotéasome doivent permettre un accès préférentiel des DRiPs aux molécules de classe I. Dans une autre étude, son équipe montre que la présentation forcée de peptides cytosoliques adressés directement à la voie de présentation par le CMH-I par une construction minigène ou une fusion à des ubiquitines n'empêche pas la présentation de peptides dérivés de DRiPs (Lev et al., 2010). Ces observations soutiennent l'idée d'une compartimentation de la traduction des ARNm permettant de traiter différemment les ARNm pour la production de protéines matures des ARNm pour la production de pCMH-I (Antón and Yewdell, 2014). Dans la continuité de leurs travaux sur les PTPs, S. Apcher *et al.* décrivent un nouvel exemple de traduction spécialisée et compartimentée et illustrent le concept controversé de traduction nucléaire (Dahlberg et al., 2003; Reid and Nicchitta, 2012; Yewdell and David, 2013). L'équipe exploite la technique de ribopuromycylation (RPM) décrite peu de temps auparavant (David et al., 2012) pour démontrer la colocalisation de ribosomes et de peptides nouvellement synthétisés dans le compartiment nucléaire (Apcher et al., 2013a). Cette

observation est confirmée par la manipulation de l'export nucléaire des ARNm. En effet, l'inhibition de l'export nucléaire des ARNm par la leptomycin B induit une augmentation de la présentation antigénique alors que l'induction de l'export nucléaire avec l'élément de réponse Rev (RRE) du HIV conduit à une diminution de la présentation antigénique. De façon intéressante, l'équipe précise que des pCMH-I sont produits par un événement précoce de traduction se déroulant avant l'épissage des introns du pré-ARNm, ces derniers pouvant donc servir de support pour la production de PTPs. L'inhibiteur de l'épissage isoginkgetine conduit d'ailleurs à une augmentation de la présentation antigénique. Dans le cadre de la sélection négative dans le thymus, la traduction nucléaire des ARNm pré-matures par les mTEC permettrait de présenter aux LT tous les variants d'épissage possibles et d'éviter par la suite l'auto-réactivité de clones contre des variants d'épissage spécifiques d'un tissu.

L'existence de ribosomes spécialisés et d'une compartimentation de la traduction permettrait donc d'expliquer la production de peptides antigéniques à partir de produits aussi éphémères que les DRiPs et les PTPs. Cependant, en comparant les cinétiques de dégradation des peptides et de translocation dans le réticulum endoplasmique, E. Reits établit que le premier processus est bien plus efficace que le second et que la demi-vie d'un peptide dans le cytosol est de sept secondes (Reits et al., 2003). Dès lors, comment expliquer qu'un peptide produit dans le compartiment nucléaire puisse survivre à un processus le conduisant jusqu'au réticulum endoplasmique pour un chargement sur une molécule de classe I ? Une explication réside dans la participation de protéines chaperonnes protégeant le peptide de la dégradation cytosolique. Cette fonction a été attribuée au facteur eucaryotique d'élongation de la traduction eEF1A qui en plus de sa capacité à adresser les tRNAs aux ribosomes dirige les peptides nouvellement formés vers le protéasome pour leur dégradation et participe à l'export nucléaire des protéines (Mateyak and Kinzy, 2010). Récemment, J.W. Yewdell et R. Fåhræus ont proposé le concept de *channeling* des peptides antigéniques que l'on pourrait traduire par un « acheminement » finement contrôlé des peptides depuis leur lieu de production vers le lieu d'apprêtement (Yewdell et al., 2019). Cette hypothèse implique une proximité physique entre les machineries de traduction, de dégradation et d'apprêtement des peptides antigéniques. La traduction d'ARNm par des ribosomes ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique (Reid and Nicchitta, 2015) ainsi que la présence de protéasomes dans le noyau (Antón et al., 1999) illustrent déjà les connexions existantes entre les différentes étapes de la formation d'un peptide antigénique.

La grande diversité des sources d'antigènes ainsi que la complexité des interactions entre les différents acteurs intervenant dans la voie de présentation antigénique (**Figure 8**) expliquent la richesse et l'importance de l'information contenue dans l'immunopeptidome du CMH-I. Le répertoire des peptides présentés à la surface cellulaire renseigne sur l'activité métabolique intracellulaire et permet de détecter des variations induites dans une situation pathologique (Caron et al., 2011). La compréhension des mécanismes de production des pCMH-I permet d'anticiper la réponse du système immunitaire et d'envisager des thérapies reposant sur le ciblage de ces antigènes. Dans la suite de ce manuscrit, nous porterons notre attention sur le cancer et sur les interactions entre la cellule cancéreuse et son environnement, notamment les populations immunitaires. Nous poserons ainsi les fondements des immunothérapies antitumorales.

## **II – La réponse immunitaire antitumorale**

### **1. La tumeur et son microenvironnement immunitaire**

Le *National Cancer Institute* (NCI) définit le microenvironnement tumoral (TME) comme « l'ensemble des cellules saines, des molécules et des vaisseaux qui entourent et nourrissent une tumeur ». Le NCI précise que la tumeur peut « changer » son microenvironnement et que ce dernier peut « affecter la croissance et la propagation de la tumeur ». Le TME est composé de plusieurs populations cellulaires, des fibroblastes (CAFs), des cellules neuroendocrines (NE), des adipocytes et des cellules immunitaires, ainsi que des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance sécrétés par ces cellules (Wang et al., 2017). A ces cellules s'ajoutent la matrice extracellulaire (ECM) (Walker et al., 2018) et les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le TME est un espace très dynamique où les interactions entre les différents protagonistes dictent l'évolution de la tumeur (Chen et al., 2015a). Pour le propos de cette thèse, nous nous concentrerons sur les cellules du système immunitaire présentes dans le TME et décrirons leur rôle dans le contrôle ou la progression de la tumeur. Nous distinguerons les cellules d'origine lymphoïde des cellules d'origine myéloïde et préciserons la valeur pronostique de la densité et de la localisation de ces populations.

## 1.1 Lymphocytes

### ✚ Lymphocytes T (LT)

Les lymphocytes T (LT) constituent environ 10% de l'infiltrat tumoral (Balkwill et al., 2012). Ils tiennent leur nom du lieu de leur production, le thymus, et se distinguent par l'expression d'un TCR et du marqueur membranaire CD3. Nous avons déjà défini deux classes de LT, les LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (CTLs) et les LT auxiliaires CD4<sup>+</sup>, en fonction de leur capacité à reconnaître à l'aide de leur TCR un épitope dans une molécule du CMH-I ou du CMH-II, respectivement. Les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques mémoires (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) spécifiques d'un antigène tumoral sont généralement associés à une forte activité antitumorale et à un bon pronostic (Fridman et al., 2012). Leur activité lytique est médiée par des enzymes de type perforines et granzymes (Lieberman, 2003). Parmi les LT auxiliaires CD4<sup>+</sup>, on distingue différentes sous-populations au regard des cytokines qu'elles sécrètent. Les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires de type Th1 produisent de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-2 et sont le principal support des CTLs. Les LT CD4<sup>+</sup> de type Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 anti-inflammatoires. Le rôle des LT Th2 est ambivalent car si plusieurs études rapportent le caractère immunosuppresseur de l'IL-10 qui inhibe la présentation croisée des antigènes par les DCs et stimule les lymphocytes T régulateurs (Treg) d'autres études montrent que l'IL-4, par exemple, exerce une activité antitumorale via le recrutement d'éosinophiles et de macrophages et que les LT Th2 stimulent les lymphocytes B (LB) (Ellyard et al., 2007; Chraa et al., 2019). Une troisième catégorie de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires, les Th17, se distingue par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires d'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22. Les LT Th17 sont impliqués dans l'immunité anti microbienne et les maladies auto-immunes. Comme les LT Th2, leur rôle dans la progression tumorale est ambivalent et dépend du type de cancer où on les retrouve (Korn et al., 2009; Chraa et al., 2019). Finalement, les LT Th9 sécrétant de l'IL-9 ont aussi une activité double dans le TME (Li and Rostami, 2010). Les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ont en revanche des propriétés pro-tumorales bien définies. Ils sécrètent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  et expriment le récepteur CTLA-4 qui inhibent les fonctions effectrices des CTLs (Togashi et al., 2019). Plus récemment décrits, les LT CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> auxiliaires folliculaires (T<sub>FH</sub>) s'accumulent dans les structures lymphoïdes tertiaires (TLS), ils stimulent l'activité des CTLs via l'IL-21 et supportent la réponse B mémoire (Ma et al., 2016; Shi et al., 2018b).

Il existe également dans le TME des LT dits non-conventionnels qui expriment un TCR particulier. Les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT) présentent un TCR semi-invariant et une restriction par la molécule du CMH-I non-conventionnelle MR1. Les MAIT contribuent à l'immunité antitumorale en sécrétant des cytokines de type Th1 et en exerçant une activité cytotoxique (Godfrey et al., 2019; Sundström et al., 2019). Les LT  $\gamma\delta$  qui expriment les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  du TCR représentent 1 à 5% de la population de LT alors que la majorité des LT (environ 70%) exprime les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Comme la plupart des sous-types de LT présentés jusqu'ici, les LT  $\gamma\delta$  ont une activité duale. Ils exercent une activité cytotoxique médiée par les perforines et les granzymes, présentent des antigènes aux LT  $\alpha\beta$  et stimulent la maturation des DCs mais ils promeuvent également l'angiogenèse et sécrètent l'IL-17 aux propriétés immunosuppressives (Zhao et al., 2018). Enfin, les cellules NKT sont des LT qui reconnaissent des lipides présentés par la molécule du CMH non-conventionnelle CD1d. Ils ont été nommés ainsi car ils sont, avec les cellules NK, parmi les premiers acteurs à intervenir dans la réponse immunitaire même si la plupart des cellules NKT murines n'expriment pas le marqueur NK1.1. Les cellules NKT de type I expriment un TCR  $V\alpha 24J\alpha 18$  qui reconnaît majoritairement l' $\alpha$ -galactosylcéramide et exercent une activité antitumorale via la sécrétion d'IFN $\gamma$  qui stimule les CTLs et les cellules NK. En revanche, les cellules NKT de type II expriment des TCR variés et stimulent les cellules immunosuppressives Treg et MDSCs. La balance entre ces populations est donc encore une fois primordiale dans la détermination de leur effet sur la progression tumorale (voir revue Terabe and Berzofsky, 2008).

### **Lymphocytes B (LB)**

Les lymphocytes B (LB) sont les principaux acteurs de l'immunité humorale médiée par la sécrétion d'anticorps. Ils constituent une population hétérogène qui peut exercer une activité antitumorale comme une activité pro-tumorale. Les LB contribuent à l'élimination de la tumeur par le mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et sécrètent des cytokines de type Th1 telles que l'IL-2, l'IL-4 ou le TNF- $\alpha$  (Lund et al., 2005). Les LB sécrètent également de l'IL-12 qui stimulent la prolifération et l'activité des LT et des cellules NK (Pham-Nguyen et al., 1999). Enfin, les LB activés sont des pAPCs qui expriment les chimiokines de costimulation CCL2, CCL5, CXCL5 et CXCL10 et qui ont la capacité de présenter des antigènes présents en faibles concentrations dans le TME et pendant une durée plus longue qu'une DC (Guo and Cui, 2019). Néanmoins, le sous-groupe des LB régulateurs (Breg) régule négativement la réponse immunitaire antitumorale en

sécrétant l'IL-10 et l'IL-35 qui inhibe la prolifération et l'activation des LT et le TGF- $\beta$  qui promeut l'activité des Treg FOXP3<sup>+</sup> (Sarvaria et al., 2017).

### **Cellules tueuses naturelles (NK)**

Les cellules tueuses naturelles (NK) sont des lymphocytes de l'immunité innée capables de reconnaître et de tuer une cellule anormale sans restriction de CMH et sans sensibilisation préalable à un antigène. Les cellules NK constituent 10 à 15% des lymphocytes circulants et sont caractérisées par l'absence du marqueur CD3 et l'expression du marqueur CD56 chez l'homme. L'activité des cellules NK est régulée par des récepteurs activateurs dépendant de la tyrosine (ITAM) qui reconnaissent des ligands de stress exprimés par la cellule cible et des récepteurs inhibiteurs de type immunoglobuline (KIR2DL et KIR3DL) ou de type lectine de type C (CD94/NKG2A/B) qui reconnaissent les molécules du CMH-I et préviennent l'auto-réactivité des cellules NK (Martinet and Smyth, 2015). L'activité cytotoxique directe des cellules NK repose sur les perforines et les granzymes ou sur l'engagement du récepteur de mort (DR) de types TRAIL ou Fas (Zamai et al., 1998). Les cellules NK sont donc des protagonistes majeurs de la réponse immunitaire antitumorale.

## **1.2 Cellules myéloïdes**

### **Macrophages associés à la tumeur (TAMs)**

Les macrophages qui infiltrent le tissu tumoral ou le TME sont appelés macrophages associés à la tumeur ou TAMs. Ils jouent de multiples rôles dans l'initiation, la progression et la dissémination tumorale par exemple via la sécrétion d'IL-17 et d'IL-23 qui participent de l'environnement pro-inflammatoire et à la croissance de la tumeur (Grivennikov et al., 2012). Les TAMs possèdent généralement un phénotype M2 caractérisé par la sécrétion des cytokines immunosuppressives IL-10, d'IL-12 et TGF- $\beta$  et par une faible capacité à présenter des antigènes (Laoui et al., 2011). Les TAMs facilitent les métastases en promouvant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), la vascularisation de la tumeur, l'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins puis leur extravasation dans les capillaires irrigant les organes et enfin la formation des niches pré-métastatiques (PMN) (voir revue Lin et al., 2019)

### **Neutrophiles associés à la tumeur (TANs)**

Un faible intérêt a pendant longtemps été porté aux neutrophiles dans le contexte de la progression tumorale car ces derniers étaient associés à la réponse antimicrobienne et à la cicatrisation et souffraient d'une durée de vie très courte (quelques heures) (Coffelt et al., 2016). Néanmoins, l'activation de l'axe CXCR2 favorise le recrutement des neutrophiles dans le lit de la tumeur et les cytokines immunosuppressives présentes dans le TME telles que le facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF), l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 augmentent leur durée de vie (Colotta et al., 1992; Fridlender and Albelda, 2012). L'activité phagocytaire des neutrophiles associés à la tumeur (TANs) est une source d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent induire des dommages de l'ADN chez les cellules épithéliales et une accumulation de mutations favorisant la croissance non contrôlée des cellules tumorales (Coffelt et al., 2016). Par ailleurs, les TANs sécrètent des cytokines pro-tumorales, notamment le TGF- $\beta$ , et les protéases CG, NE et MMP-9 qui favorisent l'EMT et le remodelage de l'ECM (Felix and Gaida, 2016). De façon générale, l'infiltration de neutrophiles dans la tumeur est de mauvais pronostic pour le patient (Shaul and Fridlender, 2019)

### **Cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)**

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) constituent une population très hétérogène de cellules immatures qui s'accumulent dans le sang et au sein de la tumeur dans le contexte d'une accélération de la myélopoïèse induite par une inflammation chronique (Abe et al., 2010; Waight et al., 2011). On distingue deux classes de MDSCs, les polymorphonucléaires (PMN-MDSCs) et les monocytiques (M-MDSCs) en fonction de leur phénotype et de leur morphologie qui les rapprochent plus d'un neutrophile ou d'un monocyte, respectivement. Les PMN-MDSCs produisent des ROS qui inhibent les fonctions effectrices des LT et induisent un phénomène d'anergie (voir revue Gabrilovich, 2017). L'activité des M-MDSCs repose à la fois sur la production de ROS et sur la sécrétion de cytokines immunosuppressives. Les MDSCs possèdent un fort caractère pro-tumoral notamment via la stimulation de la production de Treg, de la différenciation des fibroblastes en CAFs et de leur propre différenciation en TAMs immunosuppresseurs (voir revue Tesi, 2019). Le rôle des TAMs dans la progression tumorale et la formation de métastases est ainsi partagé par les MDSCs (Talmadge and Gabrilovich, 2013).

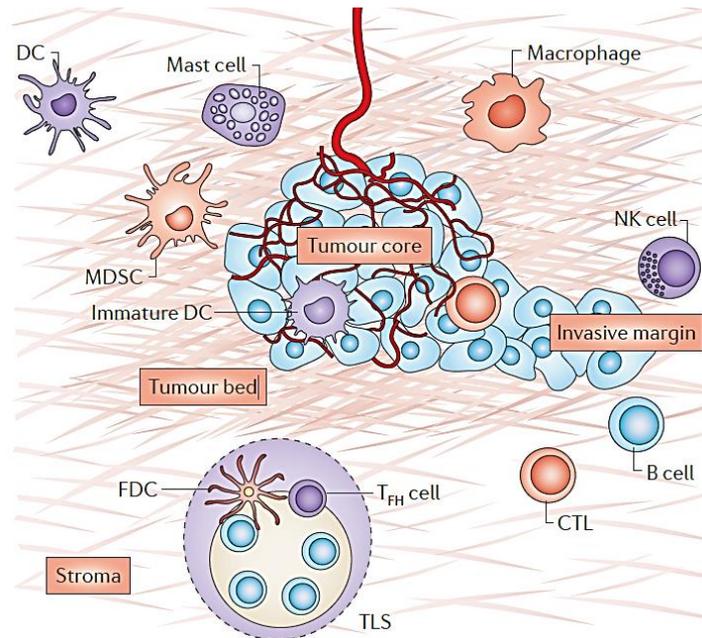
## ✚ Cellules dendritiques (DCs)

Nous avons déjà commenté le rôle primordial des DCs en tant que pAPCs, responsables de la présentation croisée des antigènes tumoraux et de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> via l'expression des molécules de co-stimulation CD40 et CD80/CD86 et de l'IL-12 immunostimulante. Les DCs représentent elles aussi une population très hétérogène et la classification des DCs chez la souris et chez l'homme est souvent révisée. Chez l'homme, l'expression différentielle des facteurs de transcription IRF4 et IRF8 permet de distinguer les DCs plasmacytoïdes (pDCs) CD123<sup>+</sup> des DCs myéloïdes conventionnelles (cDCs) qui se divisent en deux sous-groupes, les cDC1s CD141<sup>+</sup> et les cDC2s CD1c<sup>+</sup> (Collin and Bigley, 2018). Les cDCs dérivent du progéniteur commun des DCs (CDP) alors que les pDCs peuvent dériver du CDP (5 à 30% des pDCs spléniques) ou du progéniteur commun lymphoïde (CLP) (70 à 90% des pDCs spléniques). Si les deux sous-types de pDCs sécrètent les IFN de type I, seules les pDCs d'origine myéloïde, minoritaires, partagent la capacité à présenter des antigènes des cDC1s. Un environnement pro-inflammatoire et l'activation de l'axe CCR2 conduisent à la différenciation des monocytes en DCs (MoDCs) dans les tissus périphériques (peau, poumons, intestin). Même si leurs rôles sont multiples, on distingue des spécialisations pour chaque sous-type de DCs. Pour résumer, les cDC1s sont les plus efficaces pour la présentation croisée des antigènes et l'activation consécutive des LT CD8<sup>+</sup> et supportent la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> vers un profil Th1 antitumoral. Les cDC2s activent principalement les LT CD4<sup>+</sup> et promeuvent majoritairement un profil Th17 même si elles peuvent aussi induire des profils Th1, Th2 et Treg en fonction du contexte. Les mêmes propriétés, plutôt floues chez l'homme, sont attribuées aux MoDCs dans le cadre de l'inflammation. Enfin, les pDCs sécrètent des interférons de type I et III principalement dans le cadre des infections virales. Il est important de préciser que les cDCs, qui ont le phénotype antitumoral le plus favorable, sont très peu retrouvées dans le TME en raison de leurs faibles recrutements, différenciation et viabilité. Les cellules NK jouent un rôle important dans le recrutement des cDCs via l'activation de l'axe CCL5 et dans leur survie via la sécrétion de FMS-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L). Cependant, la production de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et du VEGF par la tumeur réduit la viabilité des cellules NK et inhibe l'action du FLT3L et par conséquent nuit à la survie des cDCs dans le TME. Les DCs ont donc un fort potentiel antitumoral reposant sur le recrutement des autres cellules effectrices du système immunitaire mais les composants immunosuppresseurs du TME limitent leur activité et promeuvent un phénotype anti-inflammatoire pro-tumoral (voir revue Wculek et al., 2019).

Nous avons vu que le TME constituait un système dynamique complexe où les interactions entre chacune des populations cellulaires présentes peuvent faire basculer la balance d'une activité antitumorale vers une activité pro-tumorale. Cette balance est au cœur du concept d'immunoédition tumorale qui sera détaillé par la suite. Avant cela, nous discuterons de la valeur pronostique de la densité et de la localisation des sous-types cellulaires dans le TME sur la réponse clinique observée chez le patient.

### 1.3 Valeur pronostique de l'infiltrat immunitaire

Des analyses histopathologiques ont montré que si l'ensemble des cellules immunitaires précédemment présentées pouvaient être retrouvées dans le TME de la plupart des types de tumeurs, la densité, la localisation et la polarisation de ces sous-types peuvent grandement différer. W.H. Fridman *et al.* ont résumé ces trois paramètres sous le terme de « contexture immunitaire » (Fridman et al., 2012). Ils définissent plusieurs zones où l'on peut retrouver des cellules immunitaires : le cœur de la tumeur (CT), le lit de la tumeur, le front d'invasion (IM) qui sépare le cœur de la périphérie de la tumeur et les TLS périphériques (**Figure 11**). Les macrophages, les neutrophiles, les granulocytes et les MDSCs infiltrent le CT ou restent à proximité dans le lit de la tumeur. Les CTLs se retrouvent dans l'IM ou infiltrés dans le CT mais peu dans les TLS. Ces derniers contiennent préférentiellement les DCs matures en contact avec les LT naïfs, les LT mémoires, les DCs folliculaires (FDC), les T<sub>FH</sub> et les LB. Les DCs immatures se concentrent dans le CT. Enfin, on trouve très peu de cellules NK en contact direct avec les cellules tumorales, elles s'accumulent plutôt dans le stroma. Même si la densité de l'infiltrat immunitaire varie en fonction du type de tumeur, l'infiltration de LT CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> effecteurs et mémoires est globalement associée à une meilleure survie sans maladie (DFS) après exérèse de la tumeur primaire et à une meilleure survie globale (OS). Comme nous l'avons déjà perçu dans les descriptions précédentes, la valeur pronostique des LT CD4<sup>+</sup> est bien plus compliquée à déterminer en raison de la grande diversité des profils observés. En croisant les études cliniques et précliniques, il apparaît que les LT Th1 sont majoritairement de bon pronostic, mais qu'il n'est pas possible de trancher pour les LT Th2, Th17 et Treg (Fridman et al., 2012; Chraa et al., 2019).



**Figure 11: Organisation de la contexture immunitaire (Fridman et al., 2012).**

CTL : lymphocyte T cytotoxique ; DC : cellule dendritique ; FDC : cellule dendritique folliculaire ; MDSC : cellule myéloïde suppressive ; NK cell : cellule tueuse naturelle ; T<sub>FH</sub> : lymphocyte T auxiliaire folliculaire ; TLS : structure lymphoïde tertiaire.

Il est important de préciser que les différences observées dans le rôle d'une population cellulaire en fonction des études et du type de cancer peuvent refléter des véritables spécificités tumorales mais également des biais expérimentaux liés à la difficulté de trouver les marqueurs phénotypiques les plus adaptés pour décrire une population. Les Treg, par exemple, sont souvent identifiés par l'expression de CD25 et FOXP3 mais ces marqueurs sont aussi exprimés par les LT effecteurs activés. La caractérisation de la contexture immunitaire a progressivement amené à la définition d'un score immunitaire ou Immunoscore® comme marqueur prédictif de la DFS et de l'OS. L'Immunoscore® repose sur la numération des cellules CD8<sup>+</sup> et CD45RO<sup>+</sup> dans le cœur de la tumeur et le front d'invasion, exprimée en nombre de cellules/mm<sup>2</sup>, et est présenté comme une valeur comprise entre 0 et 4, I0 reflétant une faible densité des deux populations dans les deux zones et I4 reflétant une densité élevée des deux populations dans les deux zones. La valeur pronostique de ce critère immunitaire s'est révélée très fiable notamment pour des patients atteints de cancer colorectal chez qui l'on a observé cinq ans après diagnostic 4,8% de récurrence et 86,2% de survie dans le groupe I4 contre 75% de récurrence et 27,5% de survie dans le groupe I0 (Pagès et al., 2009). On notera que Jérôme Gallon a été récompensé par le prix de l'inventeur européen 2019 pour l'Immunoscore®, soulignant les avancées permises par ce critère dans la prise en charge du

patient. En effet, l'enjeu est de pouvoir traduire ce score pronostique en valeur prédictive du bénéfice clinique d'un traitement (Angell and Galon, 2013). Jusqu'à présent les données prédictives se concentrent sur la tumeur : la surexpression d'HER2 prédit une bonne réponse au trastuzumab et la présence d'une mutation BRAF prédit l'efficacité des inhibiteurs de BRAF, par exemple. L'Immunoscore® trouve sa place parmi les biomarqueurs prédictifs de la réponse aux immunothérapies aux côtés des données sur la charge mutationnelle (Lee et al., 2019), sur le phénotype des LT circulants (Jacquelot et al., 2017) ou sur le microbiote intestinal (Routy et al., 2018) et demande à être validé dans des essais cliniques (NCT03422601).

La caractérisation des populations cellulaires qui peuplent le TME ainsi que la compréhension de leurs fonctions, souvent duales, permettent d'appréhender l'évolution de la tumeur. La cytométrie en flux ou de masse et l'immunohistochimie permettent de collecter des données à valeur pronostique sur la localisation et le statut (maturité, exhaustion) des différents acteurs de la réponse immunitaire. Dans la partie suivante, nous nous intéresserons aux expériences qui, avant le développement de ces techniques d'analyse, ont mis en évidence un rôle du système immunitaire dans le contrôle de la progression tumorale. Nous commenterons les théories de l'immunosurveillance et de l'immunoédition tumorale, successivement proposées pour expliquer l'étroite relation entre la tumeur et le système immunitaire.

## **2. Immunosurveillance et immunoédition tumorale**

### **2.1 Détection et élimination de la tumeur par le système immunitaire – Immunosurveillance des tumeurs**

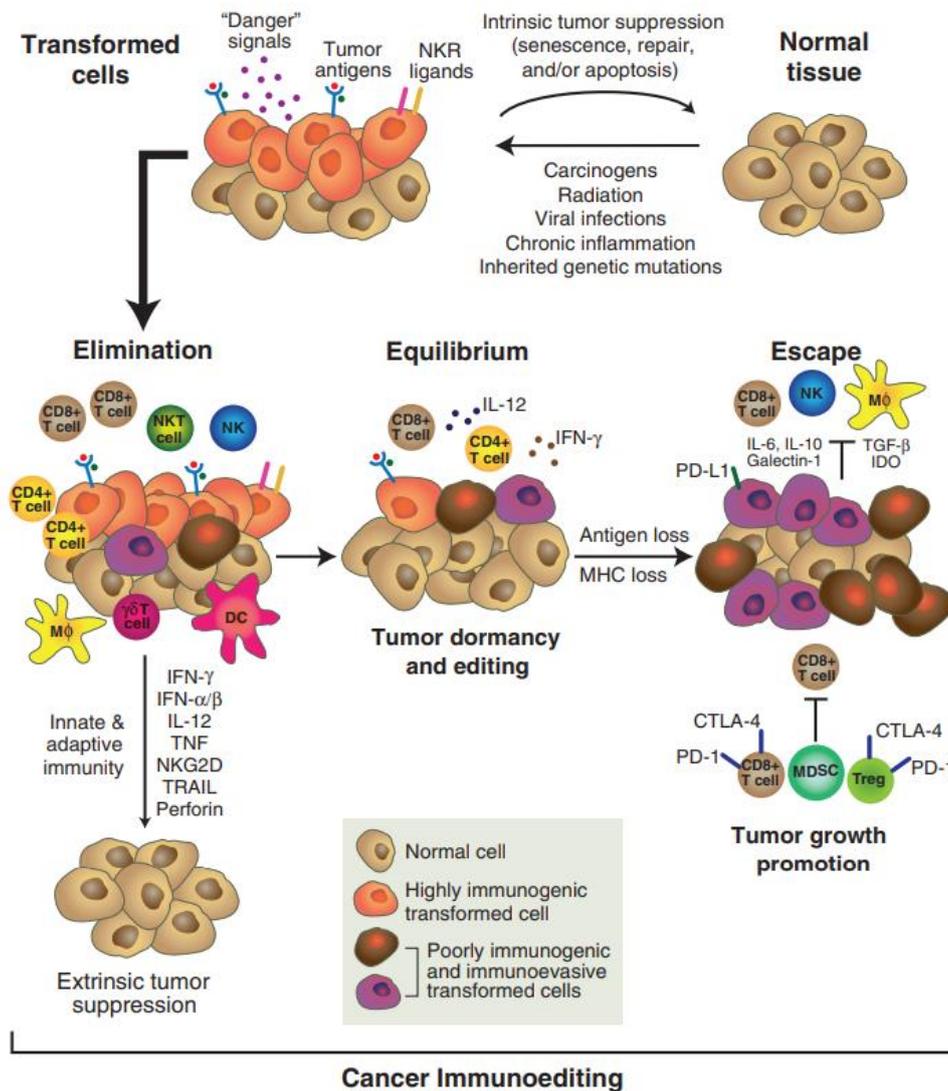
Les premières preuves de l'effet du système immunitaire sur le développement d'un cancer datent de la fin du XIXe siècle. Le chirurgien américain William Coley rapporte plusieurs cas de patients atteints de sarcomes qui ont vu leur tumeur disparaître complètement après avoir accidentellement développé un érysipèle à la suite d'une infection bactérienne sur la table d'opération (Coley, 1891). Il a alors l'idée de cultiver la souche bactérienne responsable du développement de l'érysipèle, *Streptococcus pyogenes*, et de l'inoculer volontairement à d'autres patients atteints de cancer. Les mêmes résultats spectaculaires sont observés. Coley émet trois hypothèses pour expliquer ce phénomène : (i) la bactérie s'attaque directement aux

cellules cancéreuses, (ii) la montée en température locale observée après inoculation de la bactérie suffit à tuer les cellules cancéreuses ou (iii) le sarcome a une origine bactérienne et la bactérie inoculée agit comme un antagoniste de « bacille du cancer ». Ces hypothèses sont bien sûr à considérer à la lumière des connaissances de l'époque et non des connaissances actuelles. Quelques années plus tard, le médecin et scientifique allemand Paul Ehrlich, récompensé en 1908 du prix Nobel de Physiologie et de Médecine avec l'immunologiste russe Ilya Ilitch Metchnikov pour leurs travaux sur l'immunité, postule que des cellules anormales se développent continuellement dans notre organisme mais qu'un « mécanisme positif » les détecte et les élimine avant qu'elles ne forment une tumeur (Ehrlich, 1909). Il ne dispose cependant pas des moyens de vérifier expérimentalement son hypothèse. Les premiers modèles murins sont proposés dans les années 1940-1950 et reposent sur l'utilisation du méthylcholanthrène (MCA), un hydrocarbure aromatique polycyclique, pour induire la formation de sarcomes dans des lignées consanguines de rat ou de souris. Le sarcome est obtenu après une multitude de passages entre souris consanguines, il est isolé puis inoculé à de nouvelles souris de la même lignée, dans le derme et à faibles concentrations. Plusieurs scientifiques montrent que des injections répétées à faibles doses permettent d'immuniser les souris contre la tumeur (Gross, 1943; Foley, 1953; Prehn and Main, 1957). Ils expliquent ce phénomène par l'apparition dans la tumeur de mutations induites par le méthylcholanthrène et/ou les passages successifs qui rendent le tissu tumoral « immunologiquement distinct » du tissu sain. Ces découvertes amènent le virologue australien F. Macfarlane Burnet, prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1960 avec le biologiste britannique Peter Bryan Medewar pour leur découverte de la tolérance immunologique acquise, et le médecin américain Lewis Thomas à énoncer le concept d'« immunosurveillance » pour expliquer que le système immunitaire assure la détection et l'élimination rapide des cellules néoplasiques. L'efficacité de ce phénomène repose sur l'expression par les clones tumoraux d'antigènes spécifiques de la tumeur permettant aux lymphocytes de les détecter comme du « non-soi » (Burnet, 1957; Thomas, 1959). Les deux scientifiques ont plus tard fait évoluer leur idée : L. Thomas avec une vision évolutionniste propose que l'immunosurveillance répond à « un besoin universel pour un organisme d'assurer l'uniformité des cellules qui le composent » (Thomas, 1982) tandis que F.M. Burnet insiste sur le rôle primordial du système immunitaire adaptatif dépendant du thymus dans ce phénomène (Burnet, 1970). Le concept est pourtant remis en cause par l'absence de différence observée dans la croissance de tumeurs induites par le MCA chez des souris athymiques en comparaison avec des souris sauvages (Rygaard and Povlsen, 1974; Stutman, 1974). Ces résultats contradictoires mettent en évidence que

l'immunosurveillance des tumeurs, si l'on accepte le concept, est un mécanisme plus complexe. En particulier, A.H. Greenberg et M. Greene font la lumière sur une immunosurveillance non-adaptative indépendante du thymus et décrivent le rôle des lymphocytes tueurs naturels cytotoxiques (cellules NK) (Greenberg and Greene, 1976). Dans les années 1990, le groupe de R. Schreiber est parmi les premiers à démontrer le rôle de l'IFN $\gamma$  dans l'immunosurveillance des tumeurs. Ils observent tout d'abord que la neutralisation de la fonction de l'IFN $\gamma$ , via l'utilisation d'un anticorps monoclonal ou la surexpression d'un dominant négatif de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IFN $\gamma$  IFNGR1, augmente la tumorigenicité et diminue l'immunogénicité des fibrosarcomes Meth A (Dighe et al., 1994). L'équipe confirme ces résultats chez des souris *Ifngr*<sup>-/-</sup> insensibles à l'IFN $\gamma$  et chez des souris *Stat*<sup>-/-</sup> insensibles à tous les IFN qui développent plus rapidement des tumeurs induites par le MCA ou des tumeurs spontanées après mutation du gène suppresseur de tumeurs p53 (Kaplan et al., 1998). Les travaux de S.E. Street *et al.* révèlent le rôle d'un autre médiateur moléculaire de l'immunosurveillance tumorale : la perforine. En effet, des souris *pfpr*<sup>-/-</sup> déficientes pour la perforine développent plus de tumeurs que les souris contrôles quand elles sont exposées au MCA (Street et al., 2001). La coopération entre les lymphocytes B et T et l'IFN $\gamma$  dans le cadre de l'immunosurveillance tumorale a été démontrée par le groupe de R. Schreiber qui tire profit des modèles murins *Ifngr*<sup>-/-</sup> et *Stat*<sup>-/-</sup> précédemment décrits et d'un nouveau modèle *Rag2*<sup>-/-</sup> qui ne produit ni LT ni LB matures. Les souris *Ifngr*<sup>-/-</sup>, *Stat*<sup>-/-</sup> et *Rag2*<sup>-/-</sup> développent plus rapidement des tumeurs quand elles sont exposées au MCA en comparaison avec les souris contrôles. Cependant, si les souris *Rag2*<sup>-/-</sup> x *Stat*<sup>-/-</sup> déficientes à la fois en lymphocytes et pour la signalisation médiée par les IFN développent plus de tumeurs que les souris contrôles, elles n'en développent pas plus que les souris déficientes pour un seul mécanisme (Shankaran et al., 2001). Ce résultat montre que les lymphocytes B, T et NK jouent un rôle majeur dans l'élimination des tumeurs induites par le MCA mais également qu'il existe des interactions étroites entre les lymphocytes et la voie de signalisation par l'IFN $\gamma$ . Néanmoins, l'équipe observe dans cette étude que le système immunitaire favorise également la croissance de certaines tumeurs qui ont la capacité d'échapper au système immunitaire. R. Schreiber *et al.* proposent déjà d'affiner le concept d'immunosurveillance et lui préfèrent celui d' « immunoédition » sur lequel nous reviendrons par la suite. Les études se poursuivent pour déterminer les populations de lymphocytes qui contribuent à l'immunité antitumorale. M. Girardi *et al.* observent que les souris *TCR $\beta$* <sup>-/-</sup> déficientes en lymphocytes  $\alpha\beta$  et les souris *TCR $\delta$* <sup>-/-</sup> déficientes en lymphocytes  $\gamma\delta$  développent plus de tumeurs que les

souris contrôles quand elles sont exposées au MCA mais qu'avec un autre carcinogène (ici DMBA/TPA) seules les souris  $TCR\delta^{-/-}$  développent plus de tumeurs (Girardi et al., 2001, 2003). Par ailleurs, les souris  $TCR\beta^{-/-}$  x  $TCR\delta^{-/-}$  développent plus de tumeurs que les  $TCR\delta^{-/-}$  ce qui suggère un mécanisme compensatoire par les LT  $\alpha\beta$  quand les fonctions des LT  $\gamma\delta$  sont compromises. Ces deux populations de LT contribuent donc de façons distinctes mais complémentaires à l'immunité antitumorale.

Cette synthèse chronologique non exhaustive de découvertes majeures du XXe siècle dans le domaine de l'immunité antitumorale nous a permis d'identifier les différents acteurs impliqués dans l'immunosurveillance des tumeurs. Du point de vue dynamique, l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire se déroule en quatre phases (Dunn et al., 2004). L'angiogenèse et le remodelage de l'ECM induits par la tumeur en croissance constituent des signaux pro-inflammatoires attirant les cellules de l'immunité innée (cellules NK et NKT, LT  $\gamma\delta$ , macrophages et DCs) dans le lit de la tumeur. Les signaux de danger exprimés par les cellules cancéreuses sont détectés par les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) qui sécrètent en réponse de l' $IFN\gamma$  (phase I). Les DCs immatures capturent les cellules cancéreuses apoptotiques ou nécrotiques (Larmonier et al., 2006) ou les vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules tumorales dans le TME (Duvall et al., 2016) et, sous l'action des cytokines pro-inflammatoires, migrent vers les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (TDLN) (phase II). Dans les TDLNs, les DCs présentent les antigènes tumoraux aux LT  $CD4^+$  et LT  $CD8^+$  naïfs par les mécanismes de présentation croisée précédemment décrits (phase III). Les  $CD4^+$  auxiliaires activés promeuvent l'expansion des CTLs. Enfin, les LT  $CD8^+$  et  $CD4^+$  spécifiques d'un antigène tumoral migrent vers le lit de la tumeur et les CTLs exercent leur activité lytique médiée par la perforine et les granzymes en soutien des cellules du système immunitaire inné qui poursuivent leur activité cytotoxique médiée par la perforine ou la cytokine TRAIL (phase IV). Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, certaines tumeurs peuvent échapper au système immunitaire, progresser et se disséminer même chez un individu immunocompétent. R. Schreiber propose donc que l'immunosurveillance des tumeurs constitue la première phase d'« élimination » d'un processus plus complexe désigné sous le terme d'« immunoédition » tumorale qui se décompose en trois étapes : élimination, équilibre et échappement (Dunn et al., 2004) (**Figure 12**). Cette théorie des « 3Es » prévaut toujours aujourd'hui pour expliquer le rôle dual du système immunitaire dans le développement d'une tumeur.



**Figure 12: L'immunoédition tumorale (Schreiber et al., 2011).**

CTLA-4 : Protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques ; DC : cellule dendritique ; IDO : indoléamine ; IFN : interféron ; IL : interleukine ; MΦ : macrophage ; MDSC : cellule myéloïde suppressive ; MHC : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; NK : cellule tueuse naturelle ; NKG2D : récepteur du groupe 2D des cellules tueuses naturelles ; NKR : récepteur des cellules tueuses naturelles ; PD-1 : Mort cellulaire programmée 1 ; PD-L1 : Ligand de mort cellulaire programmée 1 ; TGF : facteur de croissance transformant ; TNF : facteur de nécrose tumorale ; TRAIL : Ligand associé au facteur de nécrose tumorale induisant l'apoptose ; Treg : cellule T régulatrice.

## 2.2 Adaptation de la tumeur et échappement au système immunitaire – Immunoédition tumorale

Dans le modèle proposé par R. Schreiber, la phase d'élimination de l'immunoédition tumorale est suivie d'une phase d'équilibre entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales ayant survécu à la pression exercée par le système immunitaire. Par définition, cette phase qui peut durer plusieurs années chez le patient s'achève avec l'émergence des premiers signes cliniques. Durant cette phase de latence, les cellules tumorales les plus sensibles sont éliminées au profit de variants tumoraux résistants. L'hétérogénéité et l'instabilité génétique des cellules tumorales sont la principale cause du développement de ces clones tumoraux. Loeb *et al.* proposent que les cellules tumorales résistantes ont acquis un phénotype « mutateur » qui se manifeste par des mutations ponctuelles dans leur génome, une instabilité des microsatellites (MSI) ou chromosomique (CNI) ou une perte d'hétérozygotie (LOH) (Loeb *et al.*, 2003). Cette instabilité génomique favorise l'émergence de variants tumoraux avec une immunogénicité réduite qui sont entretenus par les acteurs immunosuppresseurs du TME. En particulier, le maintien de la tumeur dans la phase d'équilibre se joue sur la balance entre le niveau des cytokines antitumorales IL-12 et IFN $\gamma$  d'une part et le niveau des cytokines protumorales IL-10 et IL-23 d'autre part (Teng *et al.*, 2012).

Quand la balance entre acteurs antitumoraux et protumoraux penche en faveur des derniers, les cellules tumorales entrent en phase d'échappement caractérisée par des altérations de la tumeur elle-même ainsi que de son environnement. Les cellules tumorales sécrètent des cytokines immunosuppressives qui inhibent la fonction des cellules effectrices et recrutent les cellules régulatrices. Le VEGF attire les DCs immatures et les M $\Phi$  dans le TME (Bellamy *et al.*, 2001) et bloque la différenciation et la maturation des DCs via l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Oyama *et al.*, 1998). Le TGF- $\beta$  bloque également la maturation des DCs en plus d'inhiber les fonctions des LT et des cellules NK (Wrzesinski *et al.*, 2007). Les galectines et l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) affectent à la fois la prolifération et la survie des LT (Uyttenhove *et al.*, 2003; Stillman *et al.*, 2006). Enfin, le GM-CSF, l'IL-1 $\beta$ , le VEGF et le PGE $_2$ , tous sécrétés par les cellules tumorales, favorisent la prolifération des MDSCs qui inhibent l'activité des CTLs et recrutent des Treg (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). L'immunosuppression du TME est également médiée par les récepteurs inhibiteurs exprimés par les différentes cellules en présence. Les lymphocytes, en particulier les LT,

expriment les points de contrôle du système immunitaire PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 et TIGIT qui inhibent leur activité quand ces derniers rencontrent leurs ligands (Dyck and Mills, 2017). Les ligands connus de PD-1 sont PD-L1 et PD-L2, majoritairement exprimés par les cellules tumorales et les MDSCs (Curiel et al., 2003). La liaison de PD-L1 et PD-L2 à leur récepteur sur les cellules T activées s'effectue à la périphérie, pendant la phase effectrice. A l'inverse, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 et TIGIT interagissent avec leur ligand au moment du *cross-priming* des cellules T et inhibent leur activation (Anderson et al., 2016). CTLA-4 a une structure proche du CD28 et se lie aux CD80/CD86 exprimés par les DCs altérant ainsi l'intensité du signal 2 de co-stimulation (Alegre et al., 2001). LAG-3 lie le CMH-II avec une plus grande affinité que le CD4 et compromet donc l'activation des LT CD4<sup>+</sup>. Les lectines galectine-3 et LSECtine ont également été décrites comme des ligands de LAG-3 régulant l'activité des LT CD8<sup>+</sup> (voir revue Long et al., 2018). Le ligand principal de TIM-3 est la galactine-9 exprimée par les cellules cancéreuses dont la liaison induit l'apoptose des TILs (Kang et al., 2015). TIGIT est quant à lui en compétition sur les LT et les cellules NK avec le récepteur activateur DNAM-1 pour la liaison du récepteur au poliovirus (PVR) et de la nectine-2 (Solomon and Garrido-Laguna, 2018). En parallèle de la promotion d'un environnement immunosuppresseur, l'échappement de la tumeur au système immunitaire est favorisé par l'acquisition d'altérations dans la voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH qui nous intéressent particulièrement pour le propos de cette thèse. La perte d'expression des molécules du CMH-I à la surface des cellules cancéreuses est une composante majeure de l'immunosélection tumorale. F. Garrido *et al.* rapportent que cette perte d'expression du CMH-I, qui peut être totale ou limitée à un haplotype ou un allèle, varie entre 65 et 90% en fonction du type de cancer (Ruiz-Cabello et al., 1991; Garrido et al., 1997). Cette perte d'expression est le résultat de l'instabilité génétique précédemment décrite qui peut affecter les gènes codant pour la chaîne lourde de la molécule du CMH-I ou la  $\beta_2m$  sur les chromosomes 6 et 15 respectivement, ou de l'altération des différents acteurs de la voie de présentation antigénique qui ne remplissent plus leur fonction dans l'apprêtement du peptide et la formation d'un complexe peptide-CMH stable. P. Leone *et al.* proposent une synthèse des défauts observés dans de nombreuses tumeurs humaines au niveau de la machinerie de présentation des antigènes (Leone et al., 2013). Ces défauts incluent une perte d'expression des sous-unités  $\beta$  du protéasome 20S (en particulier les sous-unités inductibles LMP2 et LMP7), des transporteurs TAP1 et TAP2, des aminopeptidases ERAP1 et ERAP2 et des chaperonnes calnexine, calreticuline, tapasine et ERp57. La perte d'expression du CMH-I s'accompagne généralement d'une perte d'expression des antigènes spécifiques de la tumeur

et de l'apparition de variants de perte d'antigène (ALV) qui ne sont pas détectés par les CTLs. Nous en venons donc à nous pencher sur l'immunopeptidome du CMH-I de la cellule tumorale et sur les variations induites sur ce répertoire d'antigènes par le processus d'immunoédition.

### 3. L'immunopeptidome de la cellule tumorale

#### 3.1 Antigènes associés à la tumeur (TAAs) et antigènes spécifiques de la tumeur (TSAs)

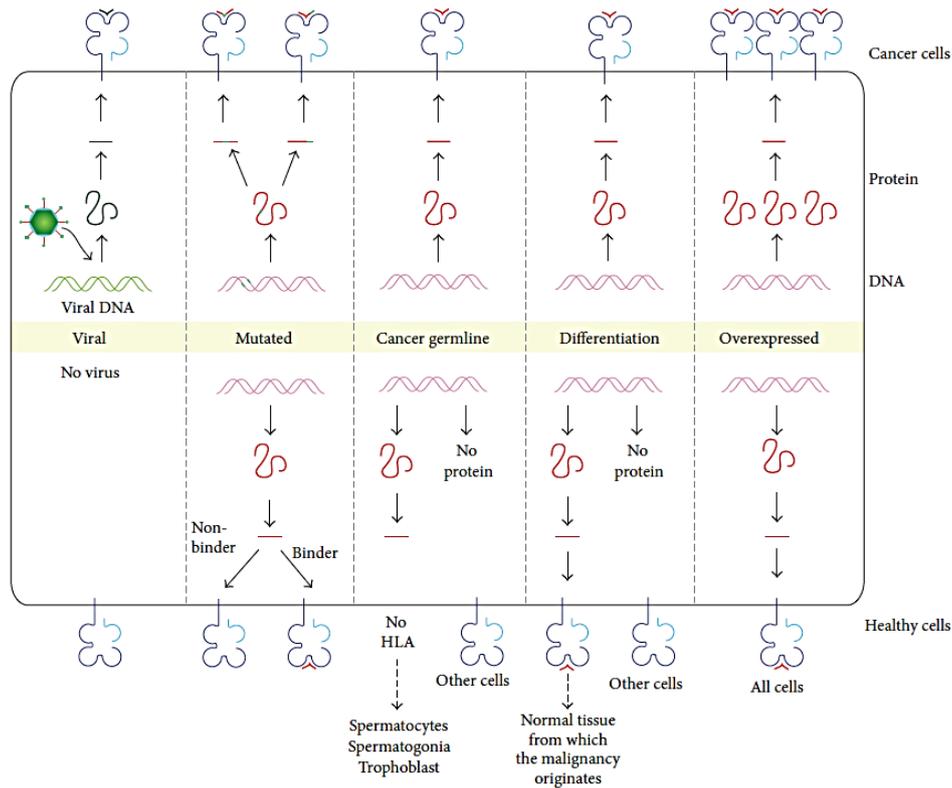
C'est au groupe de T. Boon, déjà mentionné pour sa théorie des « peptons », que l'on doit la découverte du premier antigène tumoral reconnu par des CTLs chez la souris, l'antigène de rejet p91A (Lurquin et al., 1989), et du premier antigène tumoral humain, MAGEA1, exprimé dans plusieurs mélanomes (Bruggen et al., 1991). Le premier résulte d'une mutation ponctuelle affectant une protéine ubiquitaire des mastocytomes P815 alors que le deuxième est retrouvé dans les mélanomes mais absent des tissus sains à l'exception des cellules germinales mâles et des trophoblastes. On distingue donc déjà deux classes d'antigènes et les recherches successives ont permis d'en identifier bien d'autres (Coulie et al., 2014; Vigneron, 2015).

Une classification admise des antigènes tumoraux repose sur la distinction entre les antigènes qui sont « associés » à la tumeur (TAAs) mais également exprimés dans les tissus sains, et les antigènes qui sont « spécifiques » de la tumeur (TSAs) (**Figure 13**).

##### **Antigènes avec une faible spécificité pour la tumeur (TAAs)**

Cette catégorie d'antigènes inclut les antigènes de différenciation et les antigènes surexprimés par les cellules cancéreuses. Les antigènes de différenciation sont exprimés par les cellules cancéreuses et par les cellules du tissu sain d'origine. La plupart des antigènes de ce type ont été identifiés dans les mélanomes et les mélanocytes et l'expression des gènes correspondants est sous le contrôle du facteur de transcription MITF (Hoek et al., 2008). Parmi eux, on retrouve des peptides dérivés des protéines Melan-A/MART-1, tyrosinase, gp100/PMEL, gp75/TRP1 et TRP2 qui sont associées à la pigmentation des mélanocytes (Engelhard et al., 2002; Takeuchi et al., 2003). L'identification de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de ces épitopes révèle une sélection thymique biaisée (Zippelius et al., 2002) et explique la fréquence du

vitiligo, une affection de la peau caractérisée par une dépigmentation, chez les patients atteints d'un mélanome (Le Gal et al., 2001). De manière intéressante, cette présence de LT CD8<sup>+</sup> réactifs qui se manifeste par un vitiligo est de bon pronostic pour les patients (Nordlund et al., 1983) et a encouragé le développement de vaccins thérapeutiques ciblant ces antigènes. Le succès limité de ces vaccins sera discuté dans la troisième partie de ce manuscrit. En plus des antigènes de différenciation identifiés dans les mélanomes, on trouve l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) exprimé dans les cancers colorectaux et par les cellules épithéliales saines du tractus gastro-intestinal (Sarobe et al., 2004) et les antigènes de la phosphatase acide prostatique (PAP) ainsi que l'antigène spécifique de la prostate (PSA) exprimés par les tissus sains et cancéreux de la prostate (McNeel et al., 2001; Olson et al., 2010). La surexpression d'une protéine dans le tissu cancéreux peut également entraîner la prolifération de CTLs réactifs qui n'attaquent pas ou peu le tissu sain car le niveau d'expression de la protéine y est trop bas. L'enjeu majeur est de déterminer ce seuil d'expression afin d'éviter des réactions auto-immunes. Cette famille d'antigènes inclut la protéine de la tumeur de Wilms 1 (WT1) dont le niveau d'expression est de dix à mille fois supérieur chez les patients souffrants d'une leucémie (Inoue et al., 1997), la protéine HER2 qui est surexprimée jusqu'à cent fois dans 20 à 30% des cancers du sein et de l'ovaire (Roa et al., 2014) ou d'autres protéines telles que l'inhibiteur de l'apoptose survivine (Frassanito et al., 2019), le suppresseur de tumeur p53 (Röpke et al., 1996) ou la mucine MUC1 (Roulois et al., 2013). Les antigènes surexprimés ont l'avantage d'être souvent partagés par plusieurs types de cancers ce qui rend possible, du moins en théorie, le développement d'une thérapie commune.



**Figure 13: Classification des antigènes tumoraux reconnus par des CTLs chez l'homme. (Vigneron, 2015).**

Les antigènes tumoraux sont classés en fonction de leur expression par les cellules saines (partie basse) et par les cellules tumorales (partie haute). Les antigènes viraux sont exprimés uniquement par les cellules infectées. Une mutation dans le génome de la cellule cancéreuse peut conduire à la présentation d'une version modifiée d'un peptide déjà présenté par les cellules saines (droite) ou à la présentation d'un peptide qui n'était normalement pas présenté par la cellule saine (gauche). Les antigènes des lignées germinales sont communs aux cellules cancéreuses et aux lignées germinales mâles et au trophoblaste qui connaissent un événement de déméthylation du génome. Les cellules germinales ne présentent pas l'antigène car elles sont dépourvues de molécules du CMH. Les antigènes de différenciation sont partagés entre les cellules saines et les cellules cancéreuses d'un même tissu. Les antigènes surexprimés sont exprimés à un niveau basal dans le tissu sain et à un niveau anormalement élevé dans la tumeur.

#### ✚ Antigènes avec une forte spécificité pour la tumeur (TSAs)

Il s'agit des antigènes viraux, des antigènes cancer/testis (CT) et des neoantigènes qui sont présentés uniquement par les cellules cancéreuses. De manière évidente, les antigènes viraux sont exprimés uniquement par les cellules infectées par un virus oncogène tel que le virus de l'Hépatite B (HBV), de l'Hépatite C (HCV) ou le papillomavirus humain (HPV) (Iacovides et al., 2013). On mentionnera ici le travail de longue haleine de C.J. Melief et de son groupe, en

préclinique et en clinique, sur la vaccination contre l'HPV en ciblant des épitopes des oncoprotéines virales E6 et E7 (Ressing et al., 1995; van Poelgeest et al., 2013). Les gènes cancer/testis (CT) sont une autre source importante de TSAs. C'est à cette famille d'antigènes qu'appartient MAGEA1 cité précédemment comme le premier antigène tumoral découvert chez l'homme. Ces gènes cancer/testis sont exprimés dans une grande variété de cancer ainsi que dans les cellules germinales mâles et les trophoblastes qui ont en commun un événement de déméthylation de la séquence promotrice de ces gènes (De Smet et al., 1999). Les antigènes CT sont considérés comme des TSAs car les cellules germinales mâles et les trophoblastes n'expriment pas de molécules du CMH et ne peuvent donc pas présenter les antigènes CT à leur surface (Haas et al., 1988). MAGEA1 appartient à la famille MAGE des antigènes CT exprimés par les mélanomes et qui est composée de MAGEA, MAGEB et MAGEC sur le chromosome X. On retrouve également sur ce chromosome la famille des BAGE, GAGE, LAGE/NY-ESO1 et SSX (Gjerstorff et al., 2015). Les neoantigènes ont à l'origine été définis comme les antigènes les plus spécifiques de la cellule tumorale car ils dérivent de mutations ponctuelles dans le génome de cette dernière. Ces mutations génèrent des peptides nouveaux qui résultent du remplacement d'un acide aminé rendant possible la liaison du peptide dans le sillon du CMH ou sa détection par des CTLs, d'un décalage du cadre de lecture ou d'une poursuite de la traduction au-delà du coton stop. Chez certains patients, la majorité des CTLs détectés reconnaît des neoantigènes mutés (Lennerz et al., 2005). Néanmoins, il est important de préciser que si une mutation peut conduire à la présentation d'un épitope muté dans une molécule de classe I elle ne présage en rien de son immunogénicité. La réactivité des LT contre un neoantigène est dictée par l'affinité de leur TCR pour le complexe peptide-CMH et donc par les événements de recombinaison V(D)J des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  à l'origine de la diversité des TCR (Nishana and Raghavan, 2012). La majorité des neoantigènes résulte de mutations passagères mais des mutations sur des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs peuvent également générer des neoantigènes pour lesquels une population de CTLs réactifs a pu être identifiée. Des mutations sur le gène suppresseur de tumeur *TP53* entraînent, par exemple, une prolifération anormale des cellules tumorales et l'expression de neoantigènes immunogènes reconnus par des CTLs (Deniger et al., 2018; Malekzadeh et al., 2019). A l'inverse, l'altération du gène suppresseur de tumeur *RBI* est plutôt associée à des tumeurs exprimant peu de neoantigènes immunogènes (Zhang et al., 2019a). La mutation du gène de la kinase *CDK4* chez des patients atteints de mélanomes compromet la liaison de la protéine CDK4 au suppresseur de tumeur p16INK4a et entraîne par conséquent une prolifération anormale des cellules tumorales. On retrouve chez ces

patients des CTLs dirigés contre un néoantigène muté dérivé de la protéine CDK4 (Wölfel et al., 1995). Enfin, une mutation sur le proto-oncogène de la  $\beta$ -caténine *CTNNB1* conduit au remplacement d'un acide aminé dans la séquence de la protéine et à l'expression du néoantigène muté correspondant reconnu par des TILs chez des patients atteints d'un mélanome (Robbins et al., 1996). Les antigènes mutés ne sont pas les seuls neoantigènes d'intérêt. Les antigènes spécifiques de la tumeur anormalement exprimés (aeTSA) sont codés par des ARNs qui ne sont pas exprimés par les cellules somatiques adultes et ils ne sont pas soumis à la sélection thymique. L'expression anormale de ces séquences résulte d'événements épigénétiques, affectant majoritairement les histones et la méthylation de l'ADN, qui se déroulent uniquement dans la cellule cancéreuse (Jones et al., 2019). Le groupe de C. Perrault montre que la majorité des neoantigènes exprimés dans les cancers du poumon ou les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) dérivent de séquences non-mutées et non-exoniques situées dans des introns, des régions intergéniques ou dans des cadres de lecture alternatifs (Laumont et al., 2018).

#### **Modulation de l'immunopeptidome au cours du processus d'immunoédition**

La phase d'échappement qui conclut le processus d'immunoédition est caractérisée par la persistance de clones tumoraux qui sont peu reconnus et détectés par le système immunitaire. Le groupe de R. Schreiber observe en effet que l'immunogénicité des cellules tumorales diminue au cours de la tumorigenèse et au contact des cellules immunitaires. Il observe par exemple que des sarcomes induits par le MCA dans des souris immunocompétentes poussent plus vite que des sarcomes induits par le MCA dans des souris Rag2<sup>-/-</sup> immunodéficientes lorsqu'ils sont transplantés dans des souris immunocompétentes naïves (Shankaran et al., 2001). En clinique, la perte d'expression de l'antigène MART-1 est observée chez des patients atteints d'un mélanome traités par transport adoptif de cellules T spécifiques de l'antigène MART-1 (Yee et al., 2002). De même, l'étude d'un vaccin cellulaire contenant des DCs chargées avec l'antigène MUC-1 montre que les patients qui répondent favorablement au traitement sont ceux qui développent des réponses T CD8<sup>+</sup> contre des antigènes non-ciblés par la thérapie (Wiernecky et al., 2006). Il s'agit d'une manifestation du phénomène d' « extension d'épitopes » ou *antigen spreading* (Gulley et al., 2017). Ces clones tumoraux qui réduisent leur expression d'antigènes immunogènes sont les variants de pertes d'antigènes (ALV). Ces ALVs ont été très bien observés et caractérisés dans les leucémies où on assiste à des transitions lymphoïde/myéloïde associées à une résistance aux thérapies et un mauvais

pronostic (Stass et al., 1984). Un patient atteint de leucémie aiguë lymphoblastique a par exemple rechuté après un traitement avec le blinatumomab dirigé contre le marqueur CD19 des LB et on a détecté chez lui une leucémie aiguë myéloblastique associée à des ALVs n'exprimant plus le marqueur CD19 (Duffner et al., 2016). De la même façon, des études rapportent que le traitement de divers lymphomes avec l'anticorps rituximab dirigé contre le marqueur CD20 des LB engendre des ALVs n'exprimant plus le CD20 (Vyas et al., 2017). Dans certaines conditions, les ALVs peuvent tout de même être éliminés par le système immunitaire de manière directe ou indirecte. M.T. Spiotto *et al.* montrent que l'élimination passive des ALVs nécessite que les cellules environnantes du stroma présentent des antigènes tumoraux dans des molécules du CMH (Spiotto et al., 2004). Plusieurs études précliniques montrent que l'élimination des ALVs dépend de la quantité et de la qualité des LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> retrouvés dans la tumeur. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> DUC18 sont spécifiques de l'antigène tERK présentés dans des molécules H-2K<sup>d</sup> par les cellules tumorales CMS5. K. Matsui *et al.* montrent qu'une seule injection de LT DUC18 affecte peu la croissance tumorale des CMS5 alors que deux ou trois injections conduisent à une régression complète de la tumeur en dix jours. Cependant, certaines souris rechutent approximativement dix jours après la régression complète car elles développent des ALVs résistants à la thérapie cellulaire. Il faut en réalité quatre injections de DUC18 activées pour complètement éradiquer la tumeur et prévenir le développement d'ALVs (Matsui et al., 2003). De la même manière, des doses suboptimales de LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> spécifiques des antigènes de différenciation gp100 et TRP1, respectivement, inhibent la croissance des mélanomes B16BL6-D5 mais des ALVs se développent chez 25% des animaux et forment des tumeurs « secondaires » dépigmentées (Olson and McNeel, 2012). Ici, l'équipe montre que le développement des ALVs est soutenu par la conversion des LT CD4<sup>+</sup> injectés en Treg FOXP3<sup>+</sup>. Pour contrer l'échappement de la tumeur au système immunitaire ou les rechutes associées au développement d'ALVs il semble judicieux de cibler simultanément plusieurs TAAs. Des études récentes dans le traitement des leucémies montrent que le transfert de LT spécifiques de trois TAAs, WT1, survivine et PRAME (Naik et al., 2019) ou même de cinq TAAs, WT1, survivine, PRAME, NY-ESO-1 et MAGE-A3 (Xue et al., 2019) permet un contrôle de la maladie sans toxicité aiguë. Dans la première étude, la détection de LT réactifs contre des antigènes non-ciblés (SSX2, MAGE-A4, MAGE-A1, ...) illustre une nouvelle fois le phénomène d'extension d'épitopes.

Les neoantigènes semblent être une cible idéale pour le développement d'immunothérapies antitumorales. Les LT qui reconnaissent les TSAs ont potentiellement une forte activité

lytique car ils ne sont pas soumis à la sélection thymique et ils ne s'attaquent pas aux cellules du tissu sain. Des réponses antitumorales spectaculaires peuvent être observées si plusieurs neoantigènes sont reconnus sur la tumeur par des CTLs différents. Il existe une forte corrélation (Chen, 2017) entre la charge tumorale en neoantigènes (TNB) et la charge tumorale mutationnelle (TMB) qui a été décrite comme un marqueur prédictif de l'efficacité des immunothérapies (Wu et al., 2019). Dès lors, l'identification des neoantigènes exprimés par une cellule tumorale est un enjeu majeur.

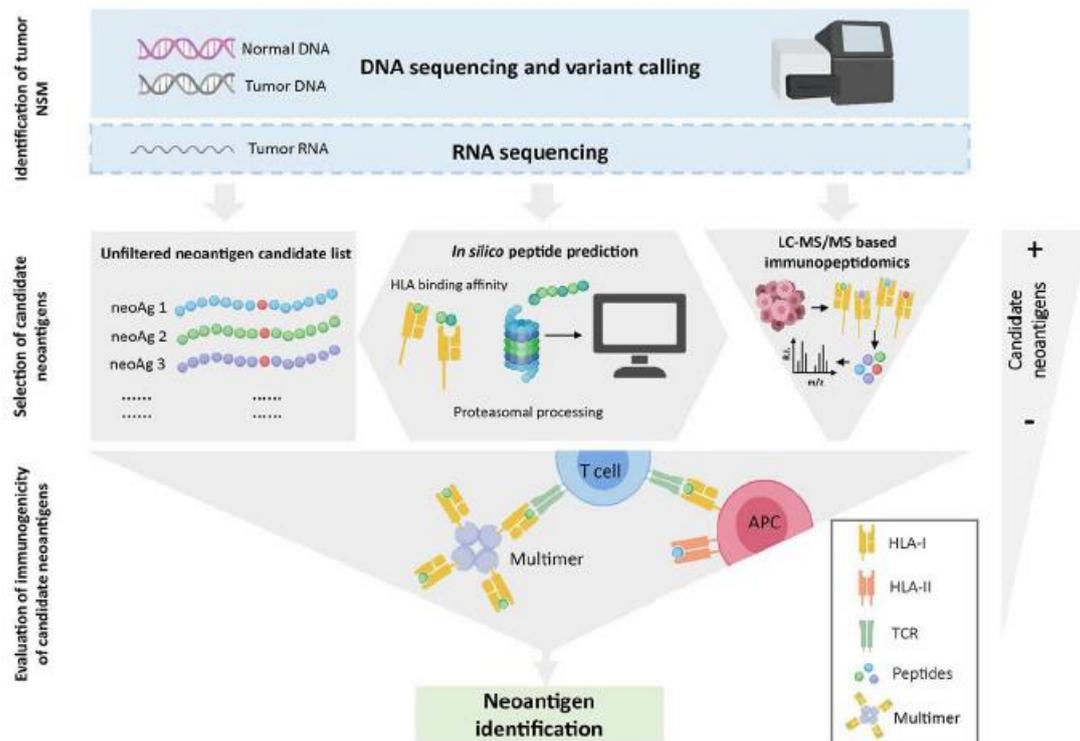
### 3.2 Techniques d'identification de néoantigènes et d'analyse de l'immunopeptidome

L'identification des premiers TAAs au début des années 1990 a reposé sur la production de CTLs stables à partir des LT du patient, isolés du sang ou de la tumeur. Pour découvrir l'antigène CT MAGEA1, T. Boon *et al.* ont d'abord cultivé des LT de patients atteints d'un mélanome en présence de cellules autologues de mélanomes irradiées jusqu'à obtenir des CTLs stables dirigées contre ces cellules autologues de mélanomes (Hérin et al., 1987). Les CTLs stables ainsi obtenus ont ensuite été mis en contact avec des APCs transfectées avec une banque de cDNAs dérivés des cellules de mélanomes. La mesure de l'activité cytolytique des CTLs par le test de relargage du chrome permet d'identifier les antigènes tumoraux, dont MAGEA1, responsables de l'activation des CTLs (Van den Eynde et al., 1989; Bruggen et al., 1991). Le criblage des banques de cDNA a permis d'identifier de nombreux TAAs, notamment dans le cas des mélanomes qui ont un fort taux de mutations, mais cela reste une méthode laborieuse qui ne permet pas d'identifier certains types d'antigènes (Lu and Robbins, 2016). L'approche en immunologie inversée consiste à sélectionner des peptides avec une bonne affinité prédictive pour le CMH-I au sein de protéines « d'intérêt » (Viatte et al., 2006). Ces protéines d'intérêt dérivent d'oncogènes et sont spécifiques du cancer ou surexprimées par les cellules tumorales. Les peptides ayant la meilleure affinité prédictive pour le CMH-I sont chargés sur des APCs afin d'évaluer leur capacité à activer des LT *in vitro*. Ces LT sont également mis en contact avec des cellules tumorales non chargées pour s'assurer que le peptide cible est bien produit et présenté par la voie de présentation antigénique endogène par le CMH-I (van der Bruggen et al., 1994). Le premier algorithme de prédiction de l'affinité d'un peptide pour une molécule de CMH, SYFPEITHI, a été développé par H.-G. Rammensee *et al.* (Rammensee et al., 1999). Depuis, d'autres algorithmes tels que

NetMHCpan (Duan et al., 2014) ou IEDB (Vita et al., 2015) ont été développés pour prédire les épitopes présentés par les principaux allèles du CMH chez diverses espèces. Néanmoins, il convient d'adopter une utilisation raisonnée de ces méthodes de prédiction qui ont des limites (Yarchoan et al., 2017). Les cellules tumorales humaines peuvent par exemple exprimer jusqu'à six molécules du CMH-I différentes et les critères de liaison qui s'appliquent à l'une ne s'appliquent pas forcément à l'autre. La difficulté est encore plus grande pour les épitopes du CMH-II qui sont généralement plus longs (11 à 20 acides aminés) et qui dépassent en dehors du sillon de liaison de la molécule du CMH-II (Nielsen et al., 2010). F. Duan *et al.*, parmi d'autres, rapportent que certains peptides dont l'immunogénicité a été validée *in vitro* et *in vivo* ont une affinité prédictive plus de cent fois supérieure au seuil de 500 nM généralement appliqué. Finalement, la question la plus importante est de savoir si ces épitopes identifiés par les algorithmes prédictifs sont immunogènes *in vivo* et susceptibles d'être de bonnes cibles pour des immunothérapies. Une étude a montré que moins de 5% des TSAs prédits par NetMHC pour trois patients porteurs d'un mélanome donnent lieu à une réponse T détectable chez le patient (Robbins et al., 2013). A l'inverse, la majorité des TSAs associés à une bonne réponse immunitaire sont prédits comme de bons ligands par les algorithmes de prédiction (van Buuren et al., 2014; Fritsch et al., 2014). Ces études montrent que ces logiciels sont sensibles mais peu spécifiques et suggèrent l'utilisation croisée de plusieurs algorithmes pour affiner la sélection. Les algorithmes de prédiction de la reconnaissance du complexe peptide-CMH par le TCR du LT peuvent permettre d'identifier les peptides immunogènes parmi ceux qui ont une bonne affinité pour les molécules du CMH. L'algorithme le plus couramment utilisé est le NetCTL/NetCTLpan qui prend en compte l'affinité de liaison pour le CMH, le clivage de l'extrémité C-terminale et la prise en charge par les transporteurs TAP (Stranzl et al., 2010). L'hydrophobicité des acides aminés en contact avec le TCR est également prédictive de l'immunogénicité des épitopes du CMH-I (Chowell et al., 2015).

Le développement des techniques de séquençage à haut débit ou « de nouvelle génération » (NGS) de l'ADN et de l'ARN ainsi que des outils de bio-informatique a permis d'accélérer la découverte de neoantigènes tumoraux mutés (Plesance et al., 2010). Le séquençage complet de l'exome (WES) combiné au séquençage de l'ARN (RNA-seq) permet d'identifier les substitutions non synonymes (NSM) qui entraînent un changement d'acide aminé uniquement dans la cellule tumorale. Des études pionnières ont permis de dresser le « mutanome » de plusieurs modèles tumoraux murins et humains (Castle et al., 2012; Robbins et al., 2013;

Rajasagi et al., 2014). Les mutations portant sur des gènes associés à la progression tumorale sont sélectionnées, l'affinité pour le CMH-I des peptides correspondants est évaluée et les meilleurs peptides sont synthétisés afin d'évaluer leur immunogénicité, *in vitro* par test ELISA ou ELISpot pour l'IFN $\gamma$ , ou *in vivo* sur le modèle murin (**Figure 14**).



**Figure 14: Procédures d'identification de neoantigènes (Garcia-Garijo et al., 2019).**

Un WES de la tumeur et du tissu sain permet d'identifier les mutations spécifiques de la tumeur. Le RNA-seq permet de sélectionner les mutations qui sont effectivement exprimées. Une fois que les mutations ont été identifiées, trois stratégies permettent de sélectionner les neoantigènes candidats dont l'immunogénicité sera évaluée : (i) aucune sélection, tous les peptides sont testés, (ii) sélection en utilisant les algorithmes de prédiction de l'affinité du peptide pour le complexe CMH-I ou (iii) sélection par analyse peptidomique basée sur la spectrométrie de masse. L'immunogénicité des neoantigènes candidats est finalement évaluée par des tests immunologiques *in vitro*.

Pour remplacer la synthèse coûteuse d'une banque de peptides, le groupe de P. Robbins a développé un criblage avec une banque de minigènes codant pour des polypeptides d'une trentaine d'acides aminés contenant en position centrale les mutations identifiées par WES (Lu et al., 2014). Cette approche a également permis l'identification de neoantigènes chez des patients souffrant de cholangiocarcinome (Tran et al., 2014) ou de cancer gastro-intestinal

(Tran et al., 2015). Si les techniques de NGS rendent possible l'identification de milliers de NSM, les tests d'immunogénicité *in vitro* requièrent généralement, pour des questions pratiques, de se restreindre à une centaine de candidats. Dans les approches précédemment citées, la sélection des peptides a été effectuée sur le critère de l'affinité de la liaison pour le CMH-I en utilisant des algorithmes de prédiction dont nous avons déjà discuté les limitations. Une autre approche développée est l'utilisation de la spectrométrie de masse et de la peptidomique afin d'identifier le répertoire de peptides effectivement présentés à la surface de la cellule tumorale. Une quantité importante de matériel biologique (100 à 500x10<sup>6</sup> cellules ou 1g de tissu) est lysée et homogénéisée et les complexes peptides-HLA sont élués en milieu acide doux (MAE) ou par immunoprécipitation (IP). L'IP est privilégiée car elle génère moins de contaminants et permet d'identifier plus de peptides que la MAE (Lanoix et al., 2018; Zhang et al., 2019b). Après IP, les peptides sont dissociés du CMH en milieu légèrement acide et purifiés avant d'être caractérisés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Pour identifier les séquences des peptides en acides aminés les données de MS/MS sont croisées avec une banque de données personnalisée générée par NGS à l'aide de logiciels de recherche tels que Proteome Discoverer<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific) ou Progenesis QI (Non Linear Dynamics) (Gonzalez-Galarza et al., 2012). La combinaison du WES, du RNA-seq et de l'immunopeptidomique basée sur la spectrométrie de masse a été détaillée dans de nombreuses études et a permis l'identification de neoantigènes d'intérêt chez la souris (Yadav et al., 2014), sur des lignées humaines (Kalaora et al., 2016) et finalement chez le patient (Bassani-Sternberg et al., 2016). Un intérêt majeur de cette approche est de pouvoir identifier les peptides naturellement présentés dans les molécules du CMH sans introduire de biais sur la taille, l'affinité pour le CMH ou l'origine prédictives du peptide. L'immunopeptidomique basée sur la spectrométrie de masse élargit le répertoire des neoantigènes en rendant possible, par exemple, l'identification de peptides portant des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation, oxydation ou cystéinylation (Mommen et al., 2014; Bassani-Sternberg et al., 2016). Par ailleurs, l'identification des pCMH-I ne se limite pas aux neoantigènes mutés. Ainsi, le groupe de C. Perrault, déjà cité précédemment, a tiré profit de cette technique pour identifier des neoantigènes d'origines non-conventionnelles et estimer leur poids dans l'immunopeptidome du CMH-I (Laumont et al., 2016, 2018). La base de données sur laquelle sont croisées les données de MS/MS est cruciale pour l'identification de neoantigènes car en spectrométrie de masse « on ne peut trouver que ce que l'on cherche » (Laumont and Perreault, 2017) et les bases de données publiques ne contiennent que les peptides dérivés des séquences présumées

codantes du génome, c'est-à-dire les exons. L'équipe a donc généré une base de données personnalisée en traduisant le transcriptome de lignées cellulaires lymphoblastoïdes B dans les six cadres de lecture. Leurs travaux révèlent que 10% des pCMH-I dérivent de séquences présumées non-codantes du génome (introns, jonctions intron-exon, régions UTR) ou d'exons traduits dans des cadres de lecture alternatifs (Laumont et al., 2016) et que la majorité des TSAs dérive de séquences non mutées mais anormalement exprimées qui n'auraient pas été identifiées par l'approche WES/RNA-seq classique (Laumont et al., 2018). Le groupe d'E.M. Van Hallen exploite les données de RNA-seq et construit sa propre base de données pour démontrer que les introns retenus (RI) sont une source de TSAs (Smart et al., 2018). En effet, des altérations du mécanisme d'épissage peuvent conduire à l'inclusion d'un intron dans l'ARNm qui peut être dégradé par le NMD et générer des pCMH-I si l'intron contenait un codon de terminaison précoce (PTC) (Apercher et al., 2011). Ces études montrent que les introns sont une source importante de TSAs d'autant plus que la rétention d'introns est un phénomène fréquemment observé dans les cellules cancéreuses (Jung et al., 2015) et que les introns contiennent plus de mutations que les exons (Frigola et al., 2017). Plus généralement, 99% des mutations observées dans les cancers sont situées sur des séquences non codantes du génome ce qui souligne une fois encore leur importance (Khurana et al., 2016). Il convient toutefois de préciser que l'immunopeptidomique basée sur la spectrométrie de masse souffre d'un défaut de sensibilité et que les peptides abondamment exprimés seront surreprésentés dans l'analyse au détriment de potentiels neoantigènes rares (Bassani-Sternberg et al., 2016). Pour contrer ce biais, une grande quantité de matériel biologique est nécessaire au départ ce qui n'est pas toujours possible pour certains modèles de tumeurs où les algorithmes de prédiction restent alors le meilleur outil.

L'utilisation du NGS, des outils de bio-informatique et de l'immunopeptidomique basée sur la spectrométrie de masse permet l'identification de neoantigènes à partir d'une biopsie du tissu tumoral du patient dans un délai de trois semaines environ (Bassani-Sternberg et al., 2016). Cette approche est donc envisageable pour le développement de thérapies personnalisées en clinique mais certains rappellent à juste titre qu'elle n'est pas encore adaptée pour des types de cancer présentant une charge mutationnelle faible (Löffler et al., 2019). Dans ce cas, les efforts doivent être portés sur l'identification d'aeTSAs, plus nombreux et pouvant être partagés par plusieurs types de tumeurs (Schuster et al., 2017; Laumont et al., 2018). Quelle que soit la nature de l'antigène identifié, son potentiel thérapeutique dépend d'au moins trois facteurs : (i) la proportion de cellules tumorales exprimant cet antigène, (ii) son niveau

d'expression par la cellule tumorale et (iii) son immunogénicité. Dès lors, il convient de répondre précisément à ces questions avant d'envisager le ciblage de cet antigène tumoral dans le cadre d'un vaccin peptidique ou d'un transfert adoptif de cellules T spécifiques. Les efforts conjoints portés sur l'amélioration des méthodes d'identification des antigènes d'intérêt et sur le contournement des mécanismes immunosuppresseurs dans le TME contribuent au développement de nouvelles immunothérapies antitumorales personnalisées.

### III – Immunothérapie antitumorale et immunomodulateurs

#### 1. Définitions

L'Institut National du Cancer définit une *immunothérapie* comme un « traitement qui vise à stimuler les défenses de l'organisme contre les cellules cancéreuses ».

On distingue deux grandes approches en immunothérapie :

- L'immunothérapie *passive* consiste à injecter au patient des anticorps monoclonaux ou des cellules immunitaires cytotoxiques préparées en laboratoire pour empêcher la prolifération des cellules tumorales.
- L'immunothérapie *active* consiste à renforcer une réponse immunitaire antitumorale déjà présente chez le patient. Elle peut être *spécifique* avec l'utilisation de vaccins thérapeutiques ciblant un antigène tumoral ou *non spécifique* si elle repose sur une stimulation globale du système immunitaire via des cytokines.

Dans le cadre de cette thèse, le terme *immunomodulateur* désigne tout composé susceptible d'amplifier la réponse immunitaire antitumorale. Cette définition inclut mais ne se restreint pas aux médicaments immunomodulateurs (IMiD) thalidomide (1<sup>ère</sup> génération), lénalidomide (2<sup>ème</sup> génération) et pomalidomide (3<sup>ème</sup> génération) notamment utilisés dans le traitement du myélome multiple (Raza et al., 2017).

Nous développerons ici (i) les vaccins thérapeutiques et le transfert de cellules T qui impliquent le ciblage spécifique d'un antigène et (ii) les combinaisons de traitements incluant ces deux stratégies.

## 2. Ciblage thérapeutique d'un antigène tumoral

### 2.1 Les vaccins thérapeutiques

Si la vaccination prophylactique a déjà fait ses preuves notamment dans la prévention du cancer du col de l'utérus causé par le papillomavirus humain (HPV) et du carcinome hépatocellulaire associé au virus de l'hépatite B (Chang et al., 2009; Perez et al., 2018), la vaccination thérapeutique contre des cancers déjà établis constitue encore aujourd'hui un défi de taille.

Les vaccins contre le cancer visent à provoquer une réaction du système immunitaire contre des antigènes tumoraux et se présentent sous différentes formes : les vaccins cellulaires (lysats de cellules tumorales autologues ou pAPC autologues stimulées *ex vivo*), les vaccins viraux (vecteurs viraux recombinants codants pour un TAA) et les vaccins moléculaires (protéines recombinantes, ADN ou ARN codant pour un TAA et peptides synthétiques). Notre attention se portera ici sur les vaccins thérapeutiques approuvés par la FDA américaine et sur la vaccination peptidique.

Malgré tous les efforts menés par les scientifiques et les avancées récentes, il n'existe à l'heure actuelle que trois vaccins thérapeutiques commercialisés contre le cancer. Le plus ancien est le TheraCys® (Sanofi Pasteur) remplacé par le TICE® BCG (Merck) recommandé pour le traitement et la prophylaxie des cancers in situ (CIS) primitifs ou récurrents de la vessie après résection trans-urétrale (RTUV) et la prophylaxie des tumeurs papillaires de stade Ta et/ou T1 primitives ou récurrentes après RTUV. Il ne repose pas sur le ciblage spécifique d'un TAA mais consiste en une instillation endovésicale du bacille de Calmette et Guérin (BCG) qui favorise une inflammation locale aiguë et une infiltration de cellules immunitaires (De Jager et al., 1991). En 2010, le Sipuleucel-T (PROVENGE, Dendreon Corporation) reçoit l'autorisation de la FDA pour le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC). Il s'agit d'un vaccin cellulaire produit à partir des cellules mononucléaires du patient prélevées au cours d'une leucaphérèse. Ces dernières sont incubées en présence d'une protéine de fusion composée de l'antigène PAP (Phosphatase Acide Prostatique) exprimé dans 95% des cas de cancer de la prostate, et du GM-CSF pour stimuler la réponse immunitaire (Graddis et al., 2011; Kantoff et al., 2010). Les DCs chargées avec l'antigène PAP sont ensuite ré-administrées au patient. Pour finir, la société Amgen

commercialise depuis 2015 le talimogene laherparepvec (l'IMLYGIC® ou T-VEC) pour le traitement des mélanomes avancés. Le T-VEC contient un virus de l'herpès (herpès simplex 1) modifié génétiquement pour exprimer le GM-CSF. Son action est double : injecté directement dans les lésions cutanées non opérables ou dans les ganglions, le virus entre dans la cellule tumorale, s'y réplique et finit par la tuer et le GM-CSF stimule les pAPCs qui présentent les antigènes tumoraux libérés après la lyse virale. Les DCs chargées peuvent ensuite migrer pour déclencher une réponse systémique notamment au niveau des sites métastatiques (Andtbacka et al., 2015).

De nombreuses études cliniques ont porté sur l'utilisation de peptides synthétiques comme vecteur d'un TAA car ces derniers présentent de multiples avantages. En effet, la synthèse de ces peptides par voie chimique est actuellement facile d'accès, peu coûteuse, rapide et robuste depuis l'invention et l'automatisation de la synthèse supportée sur phase solide (SPPS). Les techniques actuelles permettent de caractériser ces peptides avec précision et de fournir un produit pur et stable. Du point de vue biologique, les peptides synthétiques ont l'avantage de pouvoir contenir un ou plusieurs épitopes et donc de cibler la tumeur sous plusieurs angles. Ils offrent ainsi une grande flexibilité de séquences accessibles pour le scientifique. Enfin, un travail sur la séquence du peptide et sur ses propriétés physico-chimiques permet de prévenir les réactions allergiques et auto-immunes (Kumai et al., 2017; Purcell et al., 2007; Skwarczynski and Toth, 2016). Compte tenu de tous ces avantages, comment expliquer qu'aucun vaccin peptidique n'est obtenu une autorisation de la FDA ? En 2010, BMS finance le test de la combinaison ipilimumab (anti CTLA-4) + peptide gp100 sur le mélanome avancé métastatique. Le vaccin peptidique comprend les séquences YLEPGPVTV (gp100:280-288[288V]) et IMDQVPFSV (gp100:209-217[210M]) émulsionnées dans l'adjuvant Montanide ISA-51. L'OS observée avec la combinaison est de 9,95 mois, ce qui est supérieur au vaccin peptidique seul (6,44 mois) mais moins bon que l'ipilimumab seul (10,12 mois). Une amélioration de la PFS n'a pas non plus été observée (Hodi et al., 2010). La formulation de ce vaccin repose sur deux peptides courts (9 acides aminés) dérivés de l'antigène de différenciation gp100. Les CTLs reconnaissent les peptides présentés dans les molécules du CMH-I dont la longueur est majoritairement de 8 à 10 acides aminés, c'est donc logiquement que les premiers vaccins ont inclus des peptides courts (<15 acides aminés) dérivés de TAAs. Cependant, si ces peptides courts sont bel et bien capables d'induire une réponse cellulaire T CD8<sup>+</sup>, leur activité antitumorale est très limitée (Melero et al., 2014). Un peptide court ne requiert pas d'être traité et apprêté par une pAPC. En effet, les peptides courts peuvent se lier

de manière exogène aux molécules de CMH-I présentes à la surface de toutes les cellules nucléées qui sont incapables par la suite d'activer les LT CD8<sup>+</sup>. En l'absence de molécules de co-stimulation exprimées par les pAPCs, les peptides courts induisent un phénomène de tolérance et d'anergie des LT CD8<sup>+</sup> (Bijker et al., 2008). Pour contrer ces problématiques, des équipes du NCI américain propose un cocktail de peptides courts incluant les antigènes de différenciation tyrosinase, gp100 et MART-1 en combinaison avec le GM-CSF pour stimuler la réponse immunitaire. Malheureusement, ni le GM-CSF ni le vaccin peptidique n'ont permis une amélioration de l'OS ou de la survie sans récurrence (RFS) (Lawson et al., 2015). L'échec de cet essai clinique, parmi d'autres, est attribué à la faible immunogénicité de ces peptides, aux mécanismes de résistance immunosuppresseurs ou à la grande hétérogénéité des tumeurs qui font que les LT CD8<sup>+</sup> peinent à trouver et attaquer leur cible (Marincola et al., 2000). Il est désormais admis qu'une réponse T CD4<sup>+</sup> est indispensable pour soutenir la réponse T CD8<sup>+</sup> et notamment induire une réponse mémoire au long terme (Janssen et al., 2003; Kast et al., 1986; Ossendorp et al., 1998). Les peptides synthétiques longs (SLPs) sont des peptides de plus de 20 acides aminés qui ne peuvent être transformés que par des pAPCs (Rosalia et al., 2013). Les travaux de C. Melief ont largement contribué au développement des SLPs et ont démontré l'importance d'inclure dans ces peptides à la fois des épitopes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Bijker et al., 2008). Un vaccin composé de 9 SLPs contre l'oncoprotéine HPV16 E6 et 4 SLPs contre l'oncoprotéine HPV16 E7 a permis une réponse complète à 12 mois chez près de la moitié des patientes atteintes de néoplasie vulvaire intra-épithéliale (VIN). Cette réponse était associée à une prolifération détectable des LT CD8<sup>+</sup> et des LT CD4<sup>+</sup> (Kenter et al., 2009). La vaccination peptidique a connu un regain d'intérêt ces dernières années suite à la systématisation des techniques de détection des néoantigènes (voir 3.2 Techniques d'identification de néoantigènes et d'analyse de l'immunopeptidome). Spécifiques de la tumeur, ils ne sont pas sujets à la tolérance centrale thymique et constituent donc des antigènes de choix pour la formulation de vaccins peptidiques. En 2017, la preuve de l'efficacité d'un vaccin reposant sur des néoantigènes a été apportée pour le traitement du mélanome avancé (Ott et al., 2017). Des mutations somatiques ont été identifiées chez les patients par WES et leur expression vérifiée par RNA-seq. Chaque patient a reçu un cocktail de SLPs personnalisé ciblant près de vingt néoantigènes différents. Plus de deux ans après la vaccination, quatre des six patients traités ne montrent aucun signe de récurrence et chez les deux derniers patients un traitement complémentaire avec un anti PD-1 a permis une régression complète de la tumeur. Des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques des néoantigènes injectés ont été retrouvées chez les patients et il est intéressant de noter que la proportion de

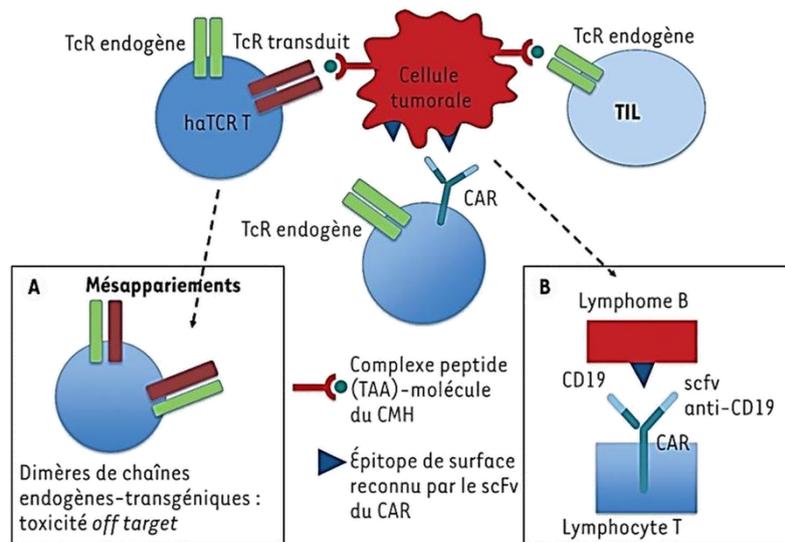
néoantigènes stimulant une réponse CD4<sup>+</sup> est nettement supérieure à celle stimulant une réponse CD8<sup>+</sup> (60% vs 20%). Un dernier résultat mérite d'être souligné dans cette étude : les chercheurs ont pu détecter des populations de cellules T réactives contre des néoantigènes absents du cocktail injecté. La vaccination a donc permis d'élargir le répertoire de cellules T spécifiques de néoantigènes. Ce phénomène d'extension d'épitopes ou *epitope spreading* apporte une solution à l'hétérogénéité tumorale et minimise les risques d'échappement de la tumeur (Gulley et al., 2017). En 2019, deux études cliniques démontrent que la vaccination peptidique ciblant des néoantigènes peut également apporter un bénéfice clinique dans le traitement des glioblastomes, des tumeurs « froides » avec une faible charge mutationnelle. Dans la première étude, les vaccins personnalisés composés de SLPs ont été formulés en suivant la démarche déployée par Ott *et al.* pour le mélanome (Keskin et al., 2019). Chez les patients qui n'ont pas reçu le traitement classique avec les corticostéroïdes, les SLPs ont induit l'infiltration de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mémoires dans la tumeur. Une analyse en cellule unique des TCR a mis en évidence des clonotypes communs entre les LT infiltrant la tumeur et les LT circulant dans le sang illustrant la migration des LT de la périphérie vers la tumeur intracrânienne. Comme pour le mélanome, bien que des algorithmes de prédiction des épitopes CMH-I aient été utilisés, une réponse T CD4<sup>+</sup> a majoritairement été observée. Dans l'étude de phase I GAPVAC-101, les patients ont été traités avec un vaccin APVAC1 composé de TAAs identifiés dans le glioblastome suivi d'un vaccin APVAC2 composé de TSAs mutés (Hilf et al., 2019). L'étude a montré que les antigènes non mutés d'APVAC1 ont induit une réponse T CD8<sup>+</sup> mémoire centrale alors que les antigènes mutés d'APVAC2 ont induit une réponse T CD4<sup>+</sup> profil Th1. Ces résultats suggèrent que dans le cas de tumeurs avec une faible charge mutationnelle les vaccinations avec des TAAs surexprimés et des TSAs plus rares sont complémentaires et peuvent induire des réponses antitumorales globales.

## 2.2 Le transfert adoptif de cellules T

Dès 1994, S. Rosenberg apporte la preuve de l'efficacité du transfert adoptif de cellules (ACT) pour le traitement du mélanome métastatique (Rosenberg et al., 1994). Des patients ont été soumis à un protocole lymphodéplétif (chimiothérapie ± radiothérapie) avant de recevoir des TILs autologues en combinaison avec de l'IL-2. Les derniers résultats rapportés en 2011 montrent une régression complète du mélanome chez près de 20% des patients, sans récurrence après trois ans (Rosenberg et al., 2011). Les TILs sont spécifiques des TAAs, ils

sont prélevés à un stade de différenciation où leur cytotoxicité est exacerbée et le prétraitement lymphodéplétif permet d'augmenter leur persistance chez le patient. Leur usage reste néanmoins limité car il n'est pas toujours possible de détecter et de prélever les TILs chez le patient et les protocoles d'expansion *ex vivo* restent longs et onéreux (Ruella and Kalos, 2014). L'efficacité d'un ACT de cellules T spécifiques de TAA est subordonnée à l'affinité du TCR de ces cellules T pour les TAA. Or, cette affinité des TCR pour les TAA est généralement faible, plus faible que pour les antigènes viraux. Cela se traduit par une meilleure efficacité des transferts adoptifs de TILs chez les patients porteurs de tumeurs induites par un virus (Aleksic et al., 2012). Dès lors, deux stratégies majeures ont été adoptées pour améliorer l'ACT, chacune impliquant la modification génétique de la cellule T. Ces approches sont illustrées dans la **Figure 15** ci-après.

La première stratégie consiste à faire exprimer par la cellule T un TCR modifié qui présente une très grande affinité pour l'antigène tumoral et créer ainsi des haTCRT pour *high affinity TCR-engineered T cell*. Différentes techniques ont permis d'optimiser l'affinité du TCR (Stone et al., 2012; Zhang and Wang, 2019) et d'aboutir à des succès cliniques (Rapoport et al., 2015; Robbins et al., 2015). Cependant, les cas rapportés de toxicité liée à l'utilisation de haTCRT viennent noircir le tableau. Le transfert de cellules T exprimant un TCR transgénique reconnaissant un épitope partagé par les antigènes de type cancer testis MAGE-A3, MAGE-A9 et MAGE A-12 a entraîné de graves atteintes neurologiques chez trois des neuf patients traités et la mort de deux d'entre eux (Morgan et al., 2013). Il s'est avéré que les haTCRT ont attaqué des cellules du cerveau exprimant l'antigène MAGE-A12. Cette toxicité secondaire est liée au mésappariement des chaînes endogènes et transgéniques du TCR qui entraîne la reconnaissance par ces « super cellules » modifiées d'antigènes présentés par les tissus sains. Par ailleurs, le transfert de TILs ou de haTCRT est soumis à la reconnaissance d'un antigène dans le contexte d'une molécule du CMH. Ceci implique que seuls les patients exprimant l'allèle HLA reconnu par les cellules T peuvent bénéficier du traitement. Par ailleurs, si dans le cadre des mécanismes d'immunoédition tumorale la tumeur exprime moins de molécules du CMH et moins d'antigènes à sa surface, l'efficacité du traitement est grandement compromise.

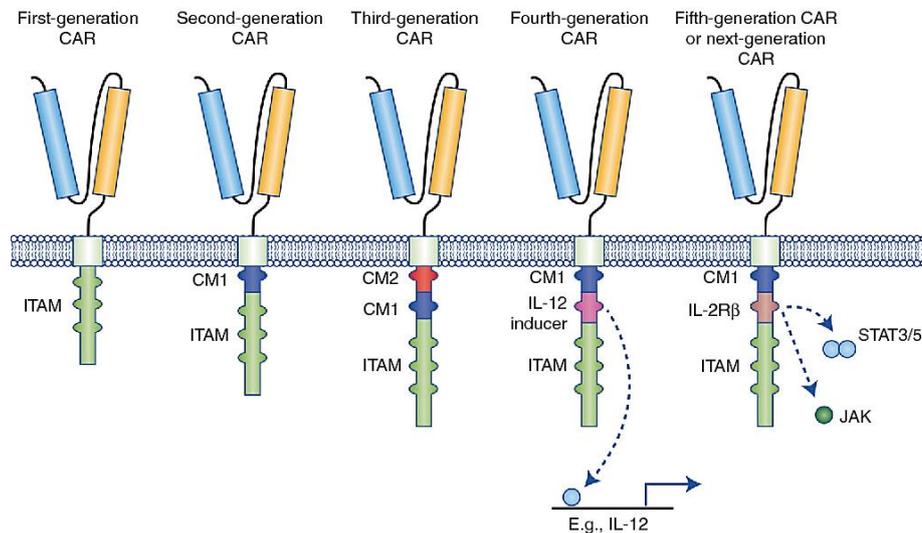


**Figure 15: Lymphocytes T modifiés par transfert de gène (Catros, 2019).**

Le TCR des LT peut être modifié pour améliorer la reconnaissance des antigènes tumoraux. Les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) et les lymphocytes T dont le TCR modifié présente une très forte affinité pour l'antigène tumoral (haTCRT) reconnaissent les TAAs présentés dans des molécules du CMH-I. Les cellules T qui portent des récepteurs chimériques (CAR) reconnaissent via le fragment ScFv de leur récepteur des antigènes présentés par la cellule tumorale indépendamment du CMH. (A) La dimérisation d'une chaîne du TCR endogène avec une chaîne du TCR modifié peut générer de la toxicité secondaire. (B) Les cellules CAR T anti-CD19 reconnaissent le marqueur de surface CD19 exprimé par les lymphomes B.

La seconde stratégie d'amélioration de l'ACT consiste à créer une cellule T qui reconnaît un TAA sans implication des molécules de CMH. C'est ainsi qu'ont été pensées les cellules CAR T pour *chimeric antigen receptor engineered T cells* qui expriment a minima un récepteur spécifique d'un TAA constitué d'un fragment variable simple chaîne (scFv), d'un domaine VH (domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps) relié par un court polypeptide flexible au domaine VL (domaine variable de la chaîne légère) du même anticorps ; un module d'ancrage transmembranaire ; et un ou plusieurs modules intracellulaires qui sont impliqués dans la signalisation lymphocytaire T (ITAMs). Les cellules CAR T sont générées par transduction de vecteurs viraux ou  $\gamma$ -rétroviraux codant pour la molécule complète décrite ci-dessus. A l'heure actuelle, la cinquième génération de cellules CAR T est en cours de développement (**Figure 16**). Le CAR contient un domaine tronqué de la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-2 contenant un site de liaison pour le facteur de transcription STAT3. L'activation spécifique de ce récepteur déclenche la signalisation du complexe CD3/TCR via le domaine

CD3 $\zeta$ , l'expression de la molécule CD28 de co-stimulation et l'activation de la voie JAK-STAT3/5 impliquée dans la signalisation cytokinique (Kagoya et al., 2018).



**Figure 16: Structure des différentes générations de cellules CAR T (Tokarew et al., 2019).**

CAR : récepteur chimérique ; CM : molécule de co-stimulation ; JAK : Janus Kinase ; IL : interleukine ; IL-2R $\beta$  : chaîne beta du récepteur à l'interleukine 2 ; ITAM : motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine ; STAT : capteur de signal et activateur de la transcription.

Le tisagenlecleucel (KYMRIA<sup>®</sup>, Novartis) est la première thérapie par cellules CAR T à avoir obtenu une autorisation de la FDA américaine en 2017 pour le traitement des enfants et des jeunes adultes atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) à cellules B réfractaire et cette autorisation a été étendue aux adultes atteints d'un certain type de lymphome non hodgkinien. Kite Pharma a ensuite obtenu l'autorisation de commercialiser l'axicabtagene ciloleucel (YESCART<sup>®</sup>) pour le traitement des lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL). Ces deux cellules CAR T sont constituées d'un récepteur chimérique ciblant l'antigène CD19 présenté par les cellules B, d'un domaine de signalisation CD3 $\zeta$  ainsi que d'un domaine de co-stimulation 4-1BB ou CD28, respectivement. L'efficacité de ces traitements est souvent spectaculaire ; on observe par exemple plus de 80% de rémission chez les patients traités avec KYMRIA<sup>®</sup> dans les trois premiers mois de l'essai. On mentionnera cependant que, comme dans bien des cas, la recherche d'une efficacité toujours plus forte va de pair avec des risques d'effets secondaires d'autant plus élevés. Le syndrome de relargage des cytokines (CRS) ou « tempête cytokinique » ainsi que les atteintes du système nerveux

central post-cellules CAR T et les moyens d'y remédier sont très bien décrits dans plusieurs revues (Bonifant et al., 2016; Yáñez et al., 2019).

Il n'est pas évident de répondre à la question qui nous intéresse en particulier pour le propos de cette thèse : quel antigène est la meilleure cible pour une immunothérapie antitumorale ? Il n'existe pas de réponse commune pour les stratégies TCR et CAR qui sont fondamentalement différentes sur leur principe (implication des molécules du CMH). Dans les deux cas, l'exigence en termes de spécificité se doit d'être élevée pour éviter les effets secondaires liés à l'expression, même faible, de l'antigène par un tissu sain. Les néoantigènes semblent répondre à cette demande et l'ACT de cellules T modifiées dont le TCR est spécifique d'un néoantigène est prometteur. La démarche reste cependant laborieuse : (i) prédiction du néoantigène par WES et analyse transcriptomique, (ii) isolation de la population de cellules T spécifiques du néoantigène (après stimulation avec des DCs chargées avec le néoantigène), (iii) caractérisation de la séquence du TCR spécifique du néoantigène, (iv) production du virus codant pour la séquence du TCR précédemment identifiée, (v) transduction du vecteur viral dans des cellules T autologues et (vi) évaluation fonctionnelle (Kato et al., 2018; Matsuda et al., 2018). Dès lors, comment adapter ce protocole à un usage en clinique ? Dans le cadre du développement de thérapie personnalisée de type TCR, E. Strønen *et al.* ont montré qu'il était possible d'identifier dans le sang de donneurs sains des populations T spécifiques de néoantigènes exprimés par des patients porteurs d'un mélanome (Strønen et al., 2016). L'isolation des TILs du patient ne devient plus un prérequis à l'identification de cellules T spécifiques d'un néoantigène et il est possible de procéder à la transduction de cellules T naïves avec le gène du TCR identifié (Hinrichs et al., 2011). Dans le cadre des thérapies de type CAR, il existe peu de TSAs reconnus par le scFv. C'est le cas du variant d'épissage EGFRvIII de l'EGFR exprimé de manière spécifique dans les glioblastomes (Sampson et al., 2008), mais la plupart des antigènes ciblés ont une expression basale faible dans un tissu sain (par exemple HER2) ou sont exprimés par une lignée cellulaire (CD19 exprimé par les cellules B). En l'absence de TSA, les améliorations en termes d'efficacité et de sécurité viendront peut-être de la génération de cellules CAR T spécifiques de deux (voire plus) TAAs. C. Kloss *et al.* ont notamment démontré le potentiel de cellules CAR T spécifiques des antigènes PSMA et PSCA qui attaquent uniquement les cellules tumorales exprimant les deux antigènes (Kloss et al., 2013).

Les vaccins thérapeutiques et les ACTs décrits jusqu'ici ont démontré leur potentiel comme immunothérapies antitumorales et des efforts continus sont portés sur l'amélioration de l'efficacité et de la spécificité des traitements. Néanmoins, il apparaît aujourd'hui primordial de penser ces immunothérapies en termes de combinaisons pour faciliter l'action et assurer la persistance de ces cellules T tueuses dans un environnement tumoral immunosuppresseur.

### **3. Les combinaisons de traitements**

#### **3.1 Choisir un bon adjuvant**

Pour optimiser l'activité des CTLs, il convient de choisir la bonne formulation et le bon adjuvant pour accompagner le traitement principal. Un adjuvant remplit deux fonctions principales : les systèmes de distribution assurent l'accessibilité de l'antigène, dans le temps et dans l'espace, pour une prise en charge efficace par les DCs ; les immunomodulateurs stimulent la réponse immunitaire par l'intermédiaire de molécules de costimulation et de cytokines.

Les adjuvants facilitant la distribution de l'antigène dans l'organisme protègent l'antigène de la dégradation par les protéases et les peptidases présentes dans le sérum et peuvent favoriser la capture de l'antigène par les DCs en l'englobant dans une microparticule ou nanoparticule mimant la taille d'un pathogène (O'Hagan and Valiante, 2003). L'adjuvant incomplet de Freund (IFA), commercialisé sous le nom Montanide™ (SEPPIC Corp.) et très répandu en clinique, est une émulsion eau dans huile ne contenant pas la bactérie *Mycobacteria tuberculosis* tuée par la chaleur. L'IFA permet un relargage prolongé dans le temps de l'antigène au niveau de site d'inoculation. Si ce dépôt permet d'induire une réponse humorale et une réponse cellulaire durables (Chiang et al., 2011), des chercheurs ont montré que la rétention de l'antigène au niveau du site d'inoculation conduisait à un état d'inflammation chronique local détournant les cellules immunitaires de la tumeur et accentuant leur exhaustion (Hailemichael et al., 2013). On notera que cet inconvénient s'applique aux vaccins contenant des peptides courts qui peuvent se fixer sur les molécules de CMH-I de toutes les cellules présentes au site de vaccination mais pas aux peptides longs qui n'induisent pas une polarisation de la réponse immunitaire. Les systèmes de distribution incluent également les nano- et microparticules, décorées ou non avec des ligands permettant leur vectorisation

(Serda, 2013), ainsi que les aluns (hydroxyde d'aluminium Alhydrogel<sup>®</sup> et phosphate d'aluminium Adju-Phos<sup>®</sup>) (Lindblad and Schønberg, 2010) qui en plus d'assurer le transport de l'antigène promeuvent la réponse cellulaire adaptative via l'activation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Sharp et al., 2009; Lamkanfi and Dixit, 2014).

Les systèmes de distribution sont utiles pour le transport de l'antigène mais ils doivent être couplés à des immunomodulateurs qui permettent d'augmenter l'efficacité de la thérapie. Nous avons déjà mentionné le GM-CSF, notamment utilisé comme adjuvant dans le T-VEC ou le GVAX, qui stimule le recrutement et la maturation des DCs ainsi que l'activation des macrophages, des neutrophiles et des cellules NK (Griffin et al., 1990). Les agonistes des récepteurs de type Toll (TLR) constituent une famille à part entière d'immunomodulateurs. Les TLR sont des récepteurs exprimés principalement par les cellules « sentinelles » de notre organisme, à savoir les DCs et les macrophages, qui reconnaissent des molécules dérivées des microbes. Le **Tableau 1** ci-après liste les TLR les plus étudiés dans le cadre du développement d'adjuvants pour les immunothérapies antitumorales ainsi que leurs agonistes connus. La stimulation de ces TLR entraîne le recrutement des molécules adaptatrices MyD88 (majoritairement) et TRIF (TLR3 et TLR4) qui propagent le signal et activent les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et IRF3, respectivement (Akira and Takeda, 2004). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) et des interférons de type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) qui stimulent la réponse immunitaire. De nombreux essais cliniques en cours incluent ces agonistes des TLRs en adjuvants de vaccins thérapeutiques ou d'inhibiteurs des points de contrôle (Smith et al., 2018). On notera les résultats prometteurs d'une étude préclinique récente qui montre une synergie entre l'agoniste TLR3 poly I:C et des cellules CAR T dirigées contre l'EGFR muté EGFRvIII sur la lignée de cancer colorectal CT26 et la lignée de cancer du sein E0771 (Di et al., 2019).

**Tableau 1: Récepteurs de type Toll dans les immunothérapies antitumorales (adapté de Kaczanowska et al., 2013; Khong and Overwijk, 2016)**

BCG : bacille de Calmette et Guérin ; cDC : cellule dendritique conventionnelle ; DC : cellule dendritique ; dsRNA : ARN double brin ; HMGB1 : protéine B1 du groupe de haute mobilité ; LB : lymphocyte B ; LPDC : cellule dendritique de la lamina propria ; LPS : lipopolysaccharide ; LT : lymphocyte T ; MΦ : macrophage ; ODN : oligonucléotides ; pDC : cellule dendritique plasmacytoïde ; TLR : récepteur de type Toll.

TLR	Cible cellulaire	Localisation cellulaire	Ligand/agoniste	Applications en clinique
<b>TLR1/2</b>	DC, MΦ, LT, LB	Surface	Lipoprotéines, peptidoglycanes, Pam3CSK4	BCG
<b>TLR3</b>	cDC, MΦ, cellules épithéliales	Endosome	dsRNA, Poly-I:C	Hiltonol®
<b>TLR4</b>	cDC, MΦ, cellules épithéliales, fibroblastes	Surface	LPS, acide lipotéichoïque, β-défensine 2, fibronectine, HMGB1, snapine, ténascine C	BCG, G100 Monophosphoryl lipide A (MPL)
<b>TLR5</b>	LPDC	Surface	Flagellin	-
<b>TLR7/8</b>	pDC, LB, MΦ, monocytes	Endosome	CpG-A, Poly G10, Poly G3	Imiquimod (Aldara®) Motolimod
<b>TLR9</b>	pDC, LB	Endosome	CpG ODN	BCG, SD101, DUK-CPG-001

### 3.2 Lever les freins de la réponse immunitaire

L'activation des cellules T entraîne inévitablement l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 et CTLA-4 comme un mécanisme de régulation. La stimulation continue du TCR promeut chez les LT l'instauration d'un phénotype d'épuisement associé à une perte de fonction très largement décrit dans la littérature (Fuertes Marraco et al., 2015; Wherry, 2011). Les anticorps anti CTLA-4 (e.g. Ipilimumab), anti PD-1 (e.g. Nivolumab, Pembrolizumab) et anti PD-L1 (e.g. Aterolizumab) en monothérapies et leurs combinaisons ont déjà fait leur preuve et ne seront pas détaillés ici (Seidel et al., 2018). On rappellera quand même que si le CTLA-4 et le PD-1 sont tous deux des régulateurs négatifs de la réponse immunitaire les

mécanismes dans lesquels ils sont impliqués diffèrent. CTLA-4 régule l'activation et la prolifération des cellules T en amont de la réponse immune, principalement dans les ganglions lymphatiques alors que PD-1 inhibe l'activité des cellules T, dans les tissus, lorsque la réponse immune est déjà en place (Buchbinder and Desai, 2016). Nous nous intéresserons ici à la combinaison des inhibiteurs des points de contrôle avec la vaccination et l'ACT de cellules TCR ou CAR T.

S. Wada *et al.* ont montré sur un modèle murin que l'administration d'anti CTLA-4 après traitement avec le vaccin GVAX (cellules tumorales irradiées exprimant le GM-CSF) dans le cancer de la prostate conduisait à une augmentation *in situ* des populations de cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices et de cellules T CD4<sup>+</sup> au profil Th1 (Wada et al., 2013). Avec le GVAX toujours, la combinaison anti CTLA-4 plus anti PD-1 entraîne la régression complète du modèle CT26 chez 100% des souris traitées associée notamment à une prolifération accrue des cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> et à une inhibition des cellules Tregs (Duraiswamy et al., 2013). En clinique, la combinaison du GVAX et de l'ipilimumab a conduit à une amélioration de l'OS (5,7 vs 3,6 mois) en comparaison avec l'ipilimumab seul (Le et al., 2013). Si on s'intéresse davantage aux vaccins ciblant un antigène, on peut noter les résultats prometteurs de la combinaison de l'ISA101 (vaccin SLP HPV E6 + HPV E7) et du nivolumab. Dans un essai de phase II, la combinaison montre une amélioration du taux de réponse objective (ORR) (33% vs ≈20%) et de l'OS (17,5 vs 9 mois) (Massarelli et al., 2019). Nous avons déjà mentionné le bénéfice thérapeutique de l'administration d'anti PD-1 à des patients atteints de mélanome avancé montrant des signes de récurrence après traitement avec un vaccin ciblant des néoantigènes (Ott et al., 2017).

L'activité des cellules T génétiquement modifiées souffre également de l'expression des récepteurs inhibiteurs après ACT mais cette inhibition peut être contrée avec un inhibiteur des points de contrôle. Très récemment, L. Pfannenstiel *et al.* ont montré une synergie entre l'ACT de cellules T spécifiques pour l'épitope HPV E7 (cellules T-E7) et un anti-PD1. Le traitement anti-PD1 permet une meilleure infiltration des cellules T-E7 dans la tumeur associée à une sécrétion augmentée d'IFN $\gamma$  (Pfannenstiel et al., 2019). Des résultats très encourageants ont pu être observés chez un patient atteint d'un DLBCL en progression après traitement avec un CAR anti-CD19 scFv (CART19). L'administration de pembrolizumab a montré un bénéfice clinique associé à une expansion des cellules CART19 et à une

diminution de l'expression de PD-1 et d'Eomes par ces mêmes cellules (Chong et al., 2017). Une autre approche consiste à modifier génétiquement la cellule CAR T pour qu'elle n'exprime plus les récepteurs inhibiteurs PD-1 ou CTLA-4 (Ren et al., 2017; Rupp et al., 2017). Ces équipes rapportent des résultats positifs *in vitro* et *in vivo* mais la suppression pure et simple de ces mécanismes régulateurs peut déclencher une auto-immunité dévastatrice qui oblige à garder la plus grande prudence. Une alternative réside dans le couplage des cellules CAR T avec des protéines de fusion immunomodulatrices. Ces CSRs pour *chimeric switch receptors* comprennent le domaine extracellulaire d'un récepteur inhibiteur fusionné au domaine cytoplasmique de la molécule de costimulation CD28 (Ankri et al., 2013; Liu et al., 2016). Quand le récepteur reconnaît son ligand, le signal de costimulation est délivré à la place du signal inhibiteur. Ces cellules CAR CSR PD1-CD28 font actuellement l'objet de deux essais cliniques visant à évaluer l'efficacité et la toxicité de la technique (voir NCT02930967 et NCT02937844).

### 3.3 Combattre l'environnement immunosuppresseur

Les mécanismes d'immunoédition tumorale qui se mettent en place en parallèle de l'établissement d'une réponse immunitaire portent atteinte à l'efficacité des traitements et empêchent l'établissement d'une réponse durable. Pour créer un environnement tumoral favorable à la réponse immunitaire et aux immunothérapies, on peut s'attacher à éliminer les cellules immunosuppressives telles que les Treg et les MDSCs et/ou promouvoir les signaux cytokiniques immunostimulants.

Le cyclophosphamide est très souvent utilisé à faibles doses pour réduire l'activité des Treg qui sont préférentiellement victimes de la molécule en raison de leur faible capacité de détoxication (Heylmann et al., 2013; Hughes et al., 2018). Une unique injection de cyclophosphamide a permis par exemple une augmentation de l'OS associée à une réduction du nombre de cellules Treg FOXP3<sup>+</sup> chez des patients atteints d'un cancer du rein et traités avec l'IMA901, un vaccin peptidique composé de neuf CD8<sup>+</sup> TAAs et d'un CD4<sup>+</sup> TAAs (Walter et al., 2012). Les Treg peuvent également être inhibés par un anticorps monoclonal anti-CD25 (daclizumab) ou par l'immunotoxine denileukin diftitox (ONTAK) qui cible les cellules exprimant fortement le CD25. Cependant, si ces techniques permettent bien de réduire la population de Treg les effets cliniques restent limités (Jacobs et al., 2010; Morse et

al., 2008). Les MDSCs peuvent également être la cible de traitements visant à les détruire, à inhiber leur développement ou leur fonction (Anani and Shurin, 2017). L'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) favorise la maturation des MDSCs accompagnée d'une perte de fonction, il améliore la réponse antitumorale dirigée contre p53 chez des patients atteints de cancer du poumon à petites cellules (SCLC) traités avec un vaccin composé de DCs transduites avec la protéine p53 (Iclozan et al., 2013).

Les vaccins thérapeutiques et les ACTs peuvent également bénéficier d'une combinaison avec des cytokines immunostimulantes qui renforcent l'activité lytique des LT et participent au maintien d'une réponse mémoire. L'IL-2 est la première cytokine à avoir été incluse dans un essai clinique en combinaison avec un vaccin, en l'occurrence un vaccin gp100 contre le mélanome (Rosenberg et al., 1998). Les chercheurs rapportent un taux de réponse objective (ORR) de 42% avec la combinaison contre 6% avec le vaccin seul. L'effet antitumoral de l'IL-2 repose sur une expansion des LT effecteurs et des cellules NK ainsi qu'une augmentation de leurs fonctions effectrices. Malgré des débuts prometteurs en clinique, l'usage de l'IL-2 en combinaison reste controversé car son efficacité s'est révélée limitée, elle promeut l'expansion des Treg et s'accompagne souvent d'un syndrome de fuite capillaire (Waldmann, 2006). L'IL-15 a également été largement étudiée. Cette cytokine joue un rôle important dans l'expansion et la persistance des LT CD8<sup>+</sup>, en particulier des LT associés à la réponse mémoire, ainsi que dans la différenciation des cellules NK (Robinson and Schluns, 2017). L'IL-15 est également impliquée dans les interactions entre DCs et cellules NK : la présentation de l'IL-15 aux cellules NK par les DCs participent de leur survie (Brilot et al., 2007). Cependant, comme pour l'IL-2, l'utilisation de l'IL-15 reste limitée par sa toxicité (voir NCT01369888 suspendu). Les interférons peuvent aussi être utilisés comme adjuvants d'un vaccin ou d'un ACT. La co-culture des cellules mononuclées du sang périphérique du patient avec des cellules autologues de mélanomes a permis de générer des LT spécifiques de la tumeur qui, administrés en combinaison avec de l'IFN $\alpha$ , ont conduit à un ORR de 20% (Verdegaal et al., 2011). Une étude préclinique chez la souris montre par ailleurs que l'injection d'IFN $\alpha$  consécutive à une vaccination ciblant l'antigène gp100 stimule la prolifération des TILs spécifiques du gp100 et conduit à la régression du modèle tumoral B16 (Sikora et al., 2009).

### 3.4 Affaiblir la tumeur

Nous nous intéressons ici aux différentes stratégies ayant pour effet principal ou secondaire d'affaiblir la tumeur et de la rendre plus sensible aux CTL spécifiques générés par la vaccination thérapeutique ou administrés par ACT.

#### **Radiothérapie**

La radiothérapie permet par exemple de contrer l'immunosélection tumorale en augmentant le nombre de molécules de classe I à la surface cellulaire ce qui résulte en une meilleure reconnaissance de la tumeur et en une infiltration accrue de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Sharma et al., 2013). La radiothérapie sensibilise les tumeurs à la lyse par les CTL notamment via la production d'IFN $\gamma$  dans le microenvironnement tumoral (Lugade et al., 2008). Un essai clinique de phase II a permis d'évaluer la combinaison du vaccin PSA/TRICOM (PROSTVAC) et de la radiothérapie (Sm-153-EDTMP ; Quadramet®) sur le CRPC. La combinaison a entraîné une augmentation de la PFS de deux mois (1,7 vs 3,7 mois) et une chute du taux de PSA supérieure à 30% (taux stable avec la radiothérapie seule) (Heery et al., 2016). Nous rappelons ici que la lymphodéplétion avec de petites doses de radiothérapie avant ACT permet également d'augmenter la persistance des cellules CAR ou TCR, même si le but n'est pas ici d'affaiblir la tumeur.

#### **Chimiothérapie**

Comme la radiothérapie, la chimiothérapie permet de sensibiliser la tumeur pour les traitements consécutifs par immunothérapie. Le cisplatine, par exemple, a été décrit comme un puissant immunomodulateur capable d'augmenter les molécules de classe I à la surface cellulaire, d'induire le recrutement et la prolifération des cellules effectrices, de renforcer l'activité lytique des CTL, tout en s'attaquant à l'environnement immunosuppresseur (de Biasi et al., 2014). Le cisplatine sensibilise particulièrement les tumeurs à la mort cellulaire induite par le TNF $\alpha$  ce qui explique la synergie observée dans un modèle préclinique avec un vaccin composé de SLPs HPV E6/E7 qui induit l'infiltration dans la tumeur de LT sécrétant du TNF $\alpha$  (van der Sluis et al., 2015). Une sensibilisation de la tumeur est également observée avec d'autres chimiothérapies telles que le cyclophosphamide, l'oxaliplatine ou la gemcitabine (Liu et al., 2010). Par ailleurs, au congrès de l'AACR fin mars-début avril 2019, C.J. Melief (ISA Pharmaceuticals) a partagé les résultats obtenus avec la combinaison de

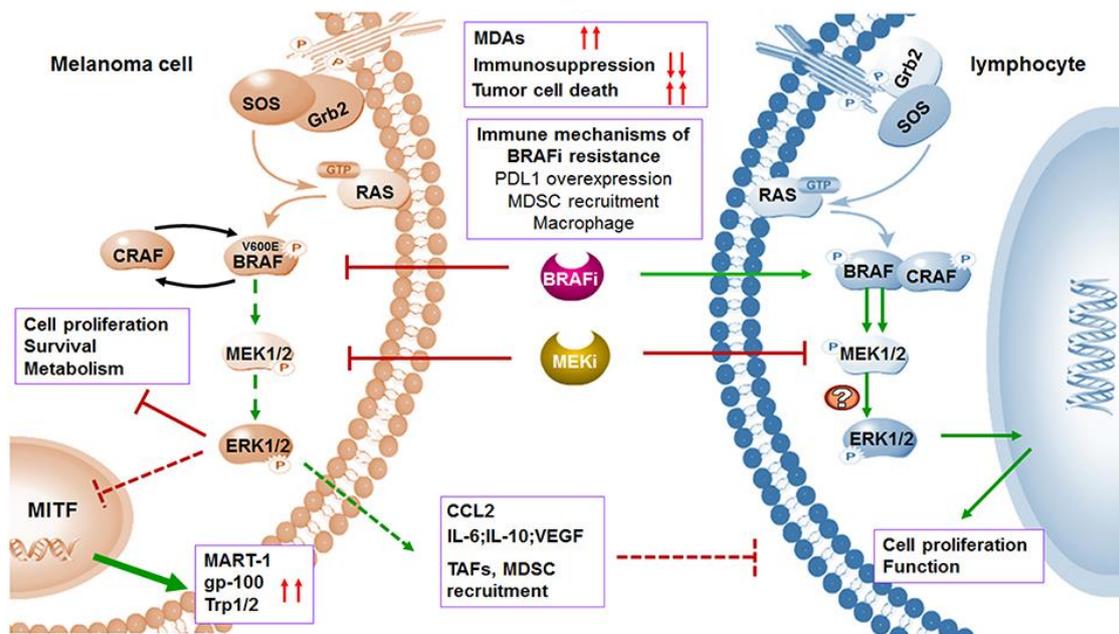
l'ISA101, décrit précédemment, avec le couple carboplatine/paclitaxel pour le traitement de patientes atteintes du cancer du col de l'utérus. Un taux de régression de la tumeur de 43% a été observé ainsi qu'un allongement de l'OS associé à une réponse T spécifique contre HPV16 et à un retour au niveau basal du nombre de cellules myéloïdes circulantes (Melief et al., 2019; Welters et al., 2016). Dans un essai de phase IIb/III, la combinaison du vaccin TG4010 composé du virus Ankara modifié pour exprimer l'antigène MUC-1 et l'IL-2 et d'une chimiothérapie (dépendante du type de tumeur) s'est révélée meilleure que la chimiothérapie seule pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) avec une augmentation de la PFS (Quoix et al., 2016). Enfin, les vaccins thérapeutiques peuvent tirer profit d'une combinaison avec des inducteurs de la mort cellulaire immunogène (ICD). L'ICD désigne la capacité d'une cellule en apoptose (principalement) à déclencher une réponse immunitaire suite à l'exposition de signaux de danger (DAMPs). Ces signaux de danger sont généralement de quatre types : (i) exposition de la calréticuline sur la surface externe de la membrane cellulaire, (ii) sécrétion d'ATP, (iii) production d'IFN de type I et (iv) relargage d'HMGB1 dans le milieu extracellulaire (Bezu et al., 2015; Zitvogel et al., 2010). Parmi les molécules induisant l'ICD, on retrouve plusieurs chimiothérapies telles que la doxorubicine, la mitoxanthrone, l'oxaliplatine ou le cyclophosphamide. La combinaison de ce dernier avec un vaccin composé de DCs chargées avec l'antigène RNF43 (Hijikata et al., 2018) ou avec un vaccin peptidique ciblant cinq TAAs (Murahashi et al., 2016) a montré un bénéfice clinique associé à une infiltration de LT CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> et à une diminution drastique des Treg dans la tumeur.

### **Thérapies ciblées**

Les immunothérapies permettent généralement une réponse antitumorale au long terme mais chez un nombre limité de patients (Prieto et al., 2012). A l'inverse, les thérapies ciblées sont efficaces sur un grand nombre de patients, si tant est que leur tumeur présente les altérations génétiques adéquates. Cependant, la réponse est rarement durable à cause de l'apparition de résistance (Nazarian et al., 2010; Giuliano et al., 2015; Luque-Cabal et al., 2016). La combinaison des thérapies ciblées et des immunothérapies semble donc judicieuse.

Une dérégulation de la voie de signalisation MAPK via les kinases RAF/MEK/ERK est, par exemple, associée à la différenciation des mélanocytes et à la progression du mélanome (Dhillon et al., 2007). Des inhibiteurs ciblant la mutation BRAF<sup>V600E</sup> (vemurafenib, dabrafenib, encorafenib) et des inhibiteurs de MEK1/2 (trametinib, cobimetinib et

binimetinib) ont été développés et leur utilisation en monothérapie ou couplée a permis l'obtention de réponses cliniques importantes mais peu durables (Chapman et al., 2011; Flaherty et al., 2012; Dummer et al., 2018). Les inhibiteurs de la voie MAPK induisent l'expression des antigènes de différenciation MART-1, gp-100, Trp-1, et Trp-2 associés au mélanome et des molécules de classe I favorisant ainsi la reconnaissance par les LT CD8+ et leur prolifération (Boni et al., 2010; Frederick et al., 2013), restaurent l'activité des DCs (Ott et al., 2013) et détruisent l'environnement immunosuppresseur (Sumimoto et al., 2006) (**Figure 17**). Les combinaisons avec les inhibiteurs des points de contrôle ont été largement évaluées et ne sont pas l'objet de ce propos (Rozeman and Blank, 2019). Le relargage d'antigènes observé avec les inhibiteurs de la voie MAPK est propice à l'ACT de TILs spécifiques des antigènes tumoraux. Dans un essai de phase I (NCT01585415), des patients atteints de mélanomes métastatiques ont été traités avec du vemurafenib pendant deux semaines puis les TILs ont été isolés à partir d'une biopsie de leur tumeur et des leucocytes ont été isolés par leucaphérèse. Après une chimiothérapie lymphodéplétive, les leucocytes ont été ré-administrés avec de l'IL-2 (Aldesleukin). L'ORR observé avec ce protocole est de 64% incluant 18% de régression complète (Deniger et al., 2017). L'exploration de la combinaison du vemurafenib et de l'ACT de TILs se poursuit dans deux essais cliniques de phase I/II en cours (NCT02354690, NCT01659151). Pour ce qui est de la combinaison des inhibiteurs de la voie MAPK et des vaccins thérapeutiques, on compte à ce jour deux essais en cours pour le traitement du mélanome avancé. Le dabrafenib (inhibiteur de BRAF) et le trametinib (inhibiteur de MEK1/2) sont associés avec un vaccin peptidique ciblant six épitopes CMH-II/CD4<sup>+</sup> (NCT02382549) ou avec le T-VEC (NCT03088176), respectivement. Cette dernière étude fait suite aux résultats cliniques encourageants observés chez deux patients touchés par un mélanome métastatique de stage IIIB/C, en progression après traitement avec plusieurs inhibiteurs de la voie MAPK, avec les inhibiteurs des points de contrôle et le GM-CSF, mais qui ont répondu favorablement au T-VEC (Chesney et al., 2018).



**Figure 17: Rationnel pour la combinaison des inhibiteurs de la voie MAPK et des immunothérapies (Yu et al., 2019).**

La mutation de l'oncogène BRAF induit une activation constitutive de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK associée à une prolifération incontrôlée des cellules tumorales. L'activation de la voie MAPK inhibe le facteur de transcription de MITF ce qui se traduit par une forte réduction de l'expression des antigènes de différenciation des mélanocytes (MDAs) MART-1, gp-100 et Trp1/2. Par ailleurs, l'activation de la voie MAPK stimule la production de molécules immunosuppressives telles que l'interleukine (IL)-6, l'IL-10 et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et favorise le recrutement des fibroblastes associés à la tumeur (TAFs) et des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs). Les inhibiteurs BRAFi et MEKi de la voie MAPK induisent une surexpression de MITF et donc des TAA à la surface cellulaire et éliminent les acteurs immunosuppresseurs dans le TME.

Les inhibiteurs de la voie MAPK, largement répandus dans le traitement du mélanome avancé, ne sont pas les seules thérapies ciblées. Le proto-oncogène HER2/neu, de la famille des récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGF), est surexprimé dans 20% à 30% des cancers du sein et confère un phénotype agressif associé à un mauvais pronostic (Slamon et al., 1987). Des anticorps monoclonaux tels que le pertuzumab (Perjeta®, Roche) ou le trastuzumab (Herceptin®, Roche) ont été développés pour inhiber l'activité du récepteur et ainsi bloquer la croissance des cellules cancéreuses (Ahmed et al., 2015). L'antigène HER2/neu a été largement étudié dans le cadre du développement de vaccins thérapeutiques car son expression dans les carcinomes mammaires peut être jusqu'à cinquante fois supérieure

à celle dans le tissu sain (Clifton et al., 2015). Le Nelipepimut-S (E75) (NeuVax<sup>TM</sup>, Galena Biopharma) est, par exemple, un peptide de neuf acides aminés dérivés du domaine extracellulaire de la HER2 qui stimule la reconnaissance des cellules tumorales exprimant HER2 par les CTLs et qui induit une réduction du nombre de Treg circulants (Hueman et al., 2006; Schneble et al., 2014). Des études précliniques ont mis en évidence qu'un prétraitement de cellules tumorales avec le trastuzumab permettait de renforcer consécutivement l'activité cytotoxique de CTLs stimulés avec le peptide E75 (Mittendorf et al., 2006). Dans la continuité de ces études, deux essais cliniques de phase II (voir NCT02297698 et NCT01570036) comparent l'efficacité de la combinaison du nelipepimut-S/GM-CSF et du trastuzumab au trastuzumab et au GM-CSF utilisés en monothérapies chez des patients avec un taux d'expression de HER2 élevé ou faible à intermédiaire, respectivement. Au congrès de l'ASCO en mars 2019, GT Clifton présente les derniers résultats de l'essai NCT01570036. L'analyse en intention de traiter (ITT) ne montre pas d'avantage significatif de la combinaison par rapport à la monothérapie (89.9% vs 83,8% RFS à 24 mois, P=0.18). En revanche, chez les patientes touchées par un cancer du sein triple négatif (TNBC), la RFS à 24 mois est de 92,6% avec la combinaison contre 70% avec la monothérapie (P=0.013). Le bénéfice clinique observé chez les patientes atteintes d'un TNBC exprimant faiblement HER2 doit être confirmé dans un essai de phase III.

La tumorigénèse s'accompagne de l'expression de molécules pro-angiogéniques telles que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Les effets pro-tumoraux de l'angiogénèse sont multiples : la formation de nouveaux vaisseaux sanguins permet un apport accru en oxygène et nutriments pour les cellules tumorales ainsi que la prolifération et la dissémination métastatique (Nishida et al., 2006). Le réseau de vaisseaux sanguins constitue également une barrière physique limitant l'accès des LT et des molécules thérapeutiques à la tumeur (Schaaf et al., 2018), favorisant ainsi un environnement immunosuppresseur. Les thérapies anti-vasculaires ciblent le VEGF, par exemple avec l'anticorps bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>, Roche) ou son récepteur à tyrosine kinase VEGFR, comme c'est le cas pour le sunitinib (Sutent<sup>®</sup>, Pfizer). Ces traitements sont utilisés, entre autres, contre les cancers urogénitaux et gastro-intestinaux mais sont limités, comme toutes les thérapies ciblées, par le développement de résistances (van Beijnum et al., 2015). La combinaison des anti-angiogéniques et des immunothérapies permettrait de faciliter l'action des LT en rendant la tumeur plus accessible et en détruisant l'environnement immunosuppresseur. Une synergie entre le sunitinib et un vaccin thérapeutique a été observée sur plusieurs modèles précliniques

quand l'anti-angiogénique est administré le premier ou dès le début du traitement afin de préconditionner l'environnement tumoral (Bose et al., 2011; Farsaci et al., 2012). Néanmoins, aucune combinaison d'un anti-angiogénique et d'un vaccin thérapeutique n'a montré de bénéfice clinique à ce jour (voir NCT01265901 et NCT01582672). Les efforts se multiplient pour comprendre les raisons de ces échecs et adapter au mieux les doses et les schémas de traitement. La combinaison avec les anti-angiogéniques est également une piste à suivre pour accroître l'efficacité de l'ACT de cellules CAR T notamment dans le cas de tumeurs solides. Sur un modèle *in vivo* de carcinome à cellules rénales, le sunitinib a permis une meilleure prolifération et une meilleure infiltration de cellules CAR T dirigées contre un antigène de l'anhydrase carbonique IX (CAIX) (Li et al., 2019).

L'immunothérapie antitumorale reposant sur le ciblage spécifique d'un ou plusieurs antigène(s) tumoral(aux) par des LT induits par un vaccin ou directement transférés chez le patient s'est montrée bénéfique dans plusieurs indications. Un choix judicieux de l'antigène ciblé permet d'accroître l'efficacité du traitement tout en limitant les toxicités secondaires pour le tissu sain. Les néoantigènes sont au cœur de l'attention du fait de leur spécificité pour la tumeur ; la standardisation des méthodes d'identification de ces néoantigènes devrait permettre le développement de thérapies de plus en plus personnalisées. Si des efforts sont portés sur l'amélioration du vaccin ou de la cellule CAR T en eux-mêmes, il est maintenant admis que les traitements à disposition doivent être combinés pour contrer les mécanismes d'immunoédition tumorale et de résistance qui s'établissent inévitablement et limitent l'action des thérapies dans le temps.

## Objectifs

---

Les mécanismes d'immunoédition tumorale qui se mettent en place en parallèle de la réponse immunitaire antitumorale conduisent à une diminution de l'expression des molécules associées à l'apprêtement et à la présentation des antigènes tumoraux ainsi qu'au renforcement d'un environnement cellulaire immunosuppresseur. De nombreuses stratégies d'immunothérapie fondées sur le ciblage spécifique d'un antigène tumoral se sont soldées par un échec car le répertoire des antigènes présentés par une cellule cancéreuse à sa surface est en constante adaptation ce qui facilite son échappement au système immunitaire (von Boehmer et al., 2013; Anagnostou et al., 2017). Dès lors, il apparaît essentiel de déterminer l'origine des antigènes tumoraux ainsi que les mécanismes conduisant à leur production afin de moduler de manière avisée leur expression et de contrer l'immunosélection tumorale.

Notre équipe, et d'autres, ont montré que les peptides d'origines non-conventionnelles représentent une part importante de l'immunopeptidome du CMH-I (Apcher et al., 2011; Antón and Yewdell, 2014; Laumont et al., 2018). Nous nous sommes intéressés aux *Pioneer Translation Products* (PTPs) qui sont produits indépendamment des protéines correspondantes, à partir d'ARNm non matures, dans le compartiment nucléaire. Cet événement de traduction précoce se produisant avant maturation de l'ARNm, les PTPs peuvent résulter de la traduction de séquences présumées non codantes telles que les régions UTR, les jonctions exon-intron et les introns. Nous avons montré que les épitopes dérivés de séquences introniques sont immunogènes et avons donc cherché à réguler leur expression pour mieux les étudier et exploiter leur potentiel. S. Apcher a déjà démontré que l'inhibiteur de l'épissage isoginkgetine (O'Brien et al., 2008) augmente la présentation antigénique d'un épitope modèle exprimé à partir d'une séquence intronique (Apcher et al., 2013a). Les travaux d'A. Pierson dans notre équipe ont conduit à l'identification du composé IP2, dérivé de l'isoginkgetine, comme un immunomodulateur de la voie de présentation antigénique par le CMH-I aux propriétés antitumorales.

J'ai dédié la majeure partie de ma thèse à approfondir l'étude de l'activité et du mode d'action du composé IP2 en explorant notamment son impact sur l'immunopeptidome du CMH-I. J'ai montré qu'IP2 modifie le répertoire de peptides présentés par les cellules cancéreuses et induit des peptides potentiellement immunogènes. J'ai ensuite évalué l'immunogénicité des peptides

induits par IP2 dans le cadre de stratégies de vaccination peptidique prophylactique et thérapeutique. Enfin, j'ai étudié la combinaison des vaccins peptidiques thérapeutiques et de l'immunomodulateur anti-PD-1. Ces travaux font l'objet du brevet international WO/2018/189210 pour lequel je suis co-inventeur et de l'article « Isoginkgetin derivative IP2 enhances the adaptive immune response against tumor antigens. » pour lequel je suis co-premier auteur et qui sera prochainement proposé pour publication.

En parallèle, nous avons cherché à savoir si les résultats obtenus avec l'isoginkgetine et son dérivé IP2 pouvaient s'appliquer à un autre inhibiteur de l'épissage, la madrasine. J'ai évalué l'effet de la madrasine et de certains dérivés hydrosolubles sur la présentation antigénique par le CMH-I et testé leur activité *in vivo*. Une collaboration étroite avec l'équipe CoSMIT dirigée par le Dr. M. Alami et le Pr. J.-D. Brion a permis de mettre en évidence les propriétés antitumorales de ces composés et a abouti au dépôt du brevet européen EP/2018/406499.7 pour lequel je suis co-inventeur.

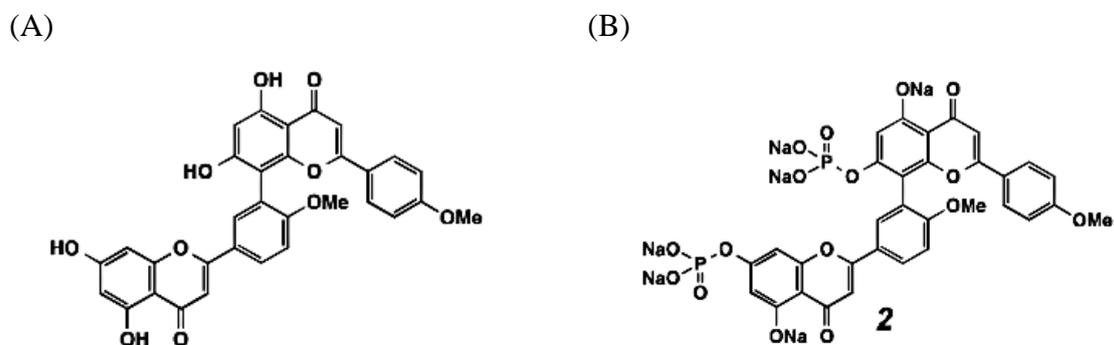
Enfin, dans le cadre de cette même collaboration, nous nous sommes intéressés aux combinaisons de traitements permettant d'améliorer l'efficacité des familles de molécules précédemment étudiées. Nous avons décrit des molécules multi-cibles aux propriétés antitumorales. Des analogues de la combretastatine A-4 (CA-4) ont montré une activité anti-vasculaire doublée d'une activité immunomodulatrice. Cette découverte a également fait l'objet du dépôt de plusieurs brevets, dont le brevet international WO/2019/207257 pour lequel je suis co-inventeur, et de plusieurs publications dont celle de Naret, T., *et al.* dans l'European Journal of Medicinal Chemistry (2018).

# Résultats

## I – Etude du composé IP2 : mode d'action, impact sur l'immunopectidome du CMH-I et applications en vaccination contre le cancer

### 1. Contexte

S. Apcher *et al.* ont montré que l'inhibiteur de l'épissage isoginkgetine augmente la présentation des antigènes dérivés des PTPs (Apcher et al., 2013a). A. Pierson a confirmé que l'isoginkgetine augmente la présentation du peptide SIINFEKL (SL8) exprimé aussi bien à partir d'un exon que d'un intron. *In vivo*, l'isoginkgetine a montré une activité antitumorale contre les sarcomes MCA205 et les mélanomes B16F10 exprimant l'épitope SIINFEKL à partir d'une séquence intronique (MCA205 globin-SL8-intron et B16F10 globin-SL8-intron). En revanche, l'inefficacité de la molécule contre les mêmes modèles tumoraux sauvages (MCA205 WT et B16F10 WT) souligne que l'activité de la molécule est limitée probablement à cause de sa biodisponibilité. En effet, la molécule d'isoginkgetine est un biflavonoïde fortement aromatique ce qui lui confère une très faible hydrosolubilité (**Figure 18A**). Nous avons donc collaboré avec l'équipe CoSMIT de la faculté de pharmacie de Chatenay Malabry afin d'obtenir des dérivés hydrosolubles de l'isoginkgetine.



**Figure 18: Structure des composés isoginkgetine et IP2.**

(A) Structure de la molécule d'isoginkgetine parentale.

(B) Structure du dérivé hydrosoluble IP2.

A. Pierson a montré qu'un dérivé hydrosoluble de l'isoginkgetine, IP2 (**Figure 18B**), conserve la capacité de la molécule parentale à augmenter la présentation antigénique de peptides dérivés de séquences exoniques et introniques. *In vivo*, le composé IP2 a montré une activité antitumorale augmentée sur les modèles MCA205 globin-SL8-intron et B16F10 globin-SL8-intron mais, plus important, il s'est révélé efficace sur les modèles WT. Le traitement avec IP2 prolonge la survie globale et confère une protection au long terme. A. Pierson a finalement montré que le composé IP2 n'a aucune activité thérapeutique dans des souris nude dépourvues de système immunitaire adaptatif. Ce résultat suggère que l'activité du composé IP2 est dépendante du système immunitaire, ce que j'ai par la suite confirmé et détaillé.

Les résultats générés par A. Pierson ne sont pas détaillés dans ce manuscrit. Ils sont cependant disponibles dans la version complète de l'article qui sera prochainement proposé pour publication (**Annexe 1**). L'ensemble des résultats sur les propriétés antitumorales du composé IP2 fait l'objet du brevet international WO/2018/189210 sur lequel je suis co-inventeur.

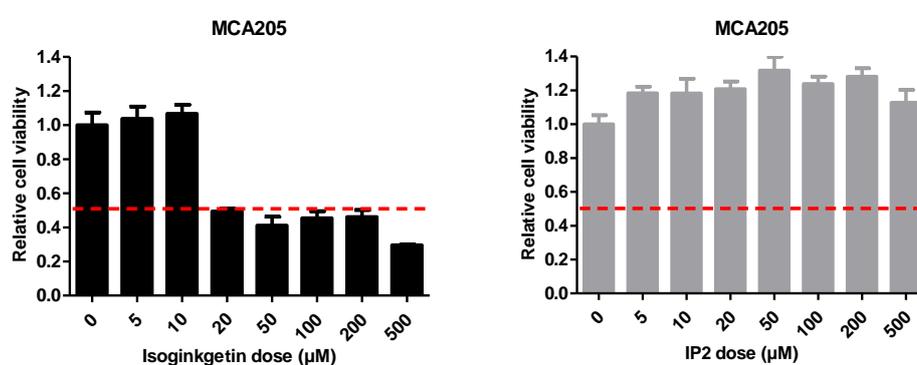
## **2. Mode d'action du composé IP2**

### **2.1 IP2 n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules tumorales**

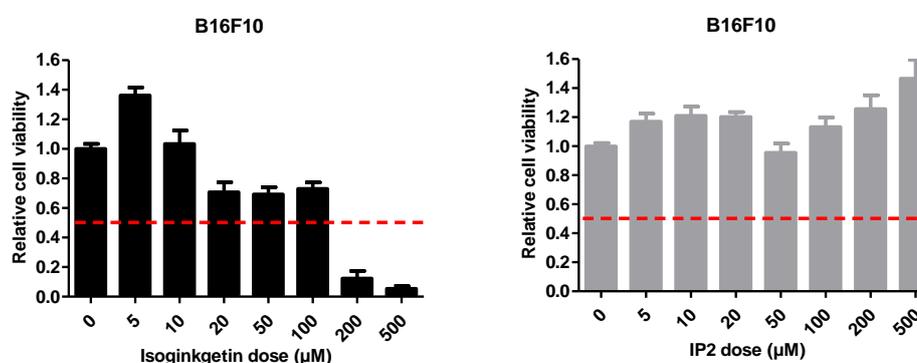
L'isoginkgetine, comme le pladielonde B, un autre inhibiteur de l'épissage, exerce une forte activité cytotoxique. Le pladielonde B induit la mort cellulaire par apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Jorge et al., 2019). Les dérivés E7107 et H3B-8800 du pladielonde B ont été testés en clinique pour leur cytotoxicité dirigée contre les cellules tumorales présentant un complexe d'épissage défectueux mais certains patients ont connu de graves effets secondaires (Hong et al., 2014). E.J. Vanzyl *et al.* ont récemment proposé que le pladienolide B et l'isoginkgetine activent le facteur de transcription ATF3 qui stimule la mort cellulaire par apoptose (Vanzyl et al., 2019). Dans le cadre de notre étude, nous cherchons à exploiter le caractère immunomodulateur des composés et non leur cytotoxicité potentielle. Nous avons donc tout d'abord comparé par test MTT la cytotoxicité du composé IP2 et de la molécule d'isoginkgetine parentale. Des cellules de sarcome MCA205 et de mélanome B16F10 ont été traitées pendant 18h avec chacun des composés à des doses comprises entre 0

et 500  $\mu\text{M}$  avant d'être mises en contact avec le sel de tétrazolium MTT. La formation de précipités de Formazan violets par réduction de l'anneau de tétrazolium est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes et métaboliquement actives. Nous avons observé que l'isoginkgetine induisait 50% de mortalité cellulaire à une dose comprise entre 10 et 20  $\mu\text{M}$  pour les MCA205 (**Figure 19A**) et 100 et 200  $\mu\text{M}$  pour les B16F10 (**Figure 19B**). En revanche, nous n'avons observé aucune activité cytotoxique du composé IP2 sur les MCA205 et les B16F10 entre 0 et 500  $\mu\text{M}$ .

(A)



(B)



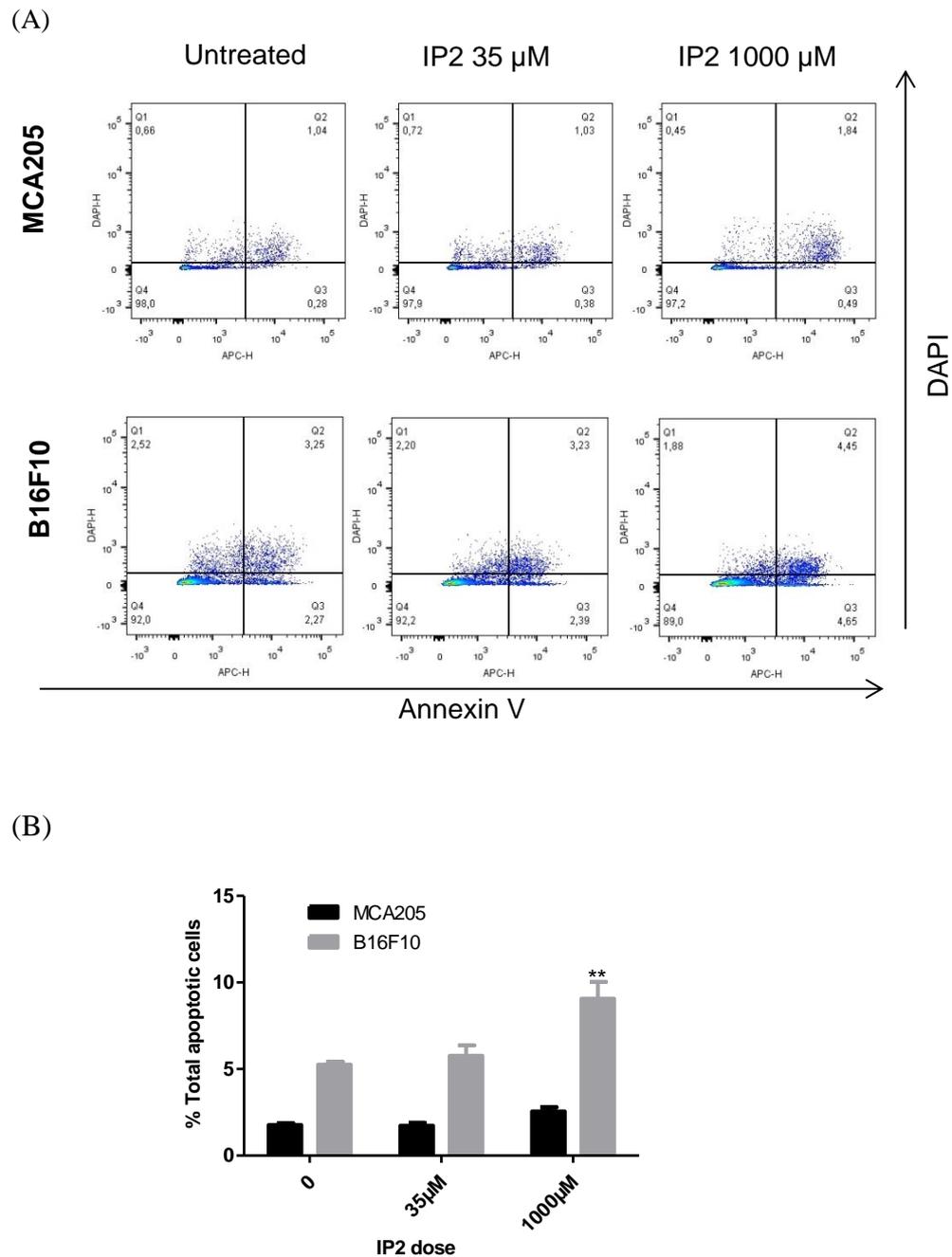
**Figure 19: Toxicité des composés isoginkgetine et IP2 évaluée par test MTT.**

(A) Test MTT réalisé sur les MCA205 avec l'isoginkgetine (à gauche) et IP2 (à droite).

(B) Test MTT réalisé sur les B16F10 avec l'isoginkgetine (à gauche) et IP2 (à droite).

Dans le but d'observer l'effet d'IP2 sur l'entrée en apoptose des cellules traitées, nous avons ensuite procédé à un double marquage DAPI/Annexin V suivi d'une analyse en cytométrie en flux. Nous avons testé deux concentrations : 35  $\mu\text{M}$  qui est la concentration maximale utilisée

dans nos tests *in vitro* et 1000  $\mu\text{M}$  qui est une concentration extrême. L'analyse révèle que dans la gamme de concentrations utilisées dans notre étude le traitement n'induit pas l'entrée des cellules en apoptose (**Figure 20**).



**Figure 20: Evaluation de l'apoptose induite par IP2.**

(A) Représentation graphique des populations.

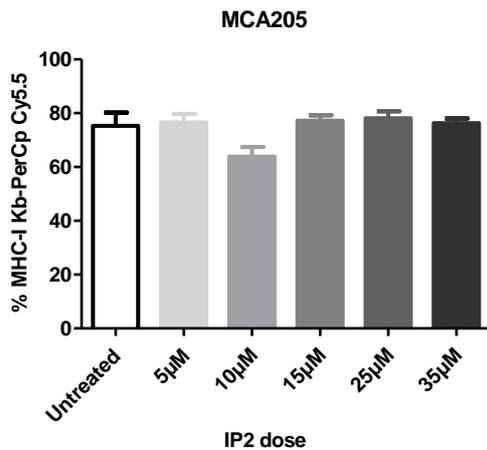
(B) Proportion de cellules engagées dans le processus d'apoptose (précoce et tardive).

Ces résultats montrent que l'effet observé d'IP2 sur la présentation antigénique n'est pas lié à une activité cytotoxique et nous confortent dans notre idée d'exploiter les propriétés immunomodulatrices du composé.

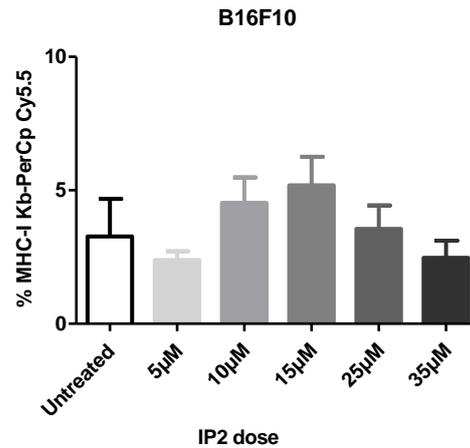
## 2.2 IP2 n'influe pas sur l'expression des molécules de CMH-I à la surface cellulaire

En utilisant le modèle SIINFEKL, nous avons montré qu'IP2 augmente la présentation antigénique d'un épitope dérivé d'une séquence intronique (**Annexe 1**). Cette observation peut être le résultat d'au moins deux mécanismes : (i) le traitement avec IP2 induit une augmentation de l'expression du peptide SIINFEKL qui est donc apprêté et présenté en plus grande quantité dans les molécules du CMH-I ou bien (ii) le traitement avec IP2 induit l'expression de davantage de molécules de CMH-I à la surface cellulaire qui peuvent donc accueillir plus de peptides. Une augmentation du nombre de molécules de CMH-I à la surface cellulaire est par exemple observée avec des chimiothérapies comme le cisplatine (de Biasi et al., 2014). Pour tester cette hypothèse nous avons traité les cellules MCA205 et B16F10 pendant 18h avec des doses d'IP2 comprises entre 0 et 35 $\mu$ M et avons mesuré le niveau d'expression des molécules du CMH-I H-2K<sup>b</sup> en cytométrie en flux. Nous n'avons observé aucune variation significative de la quantité de molécules H-2K<sup>b</sup> à la surface des cellules MCA205 (**Figure 21A**) et B16F10 (**Figure 21B**) après traitement avec IP2. On notera que le taux d'expression des molécules de CMH-I à la surface des B16F10 est très faible ce qui participe de la faible immunogénicité de ces cellules tumorales.

(A)



(B)



**Figure 21: Effet d'IP2 sur les molécules H-2K<sup>b</sup> à la surface des cellules MCA205 et B16F10.**

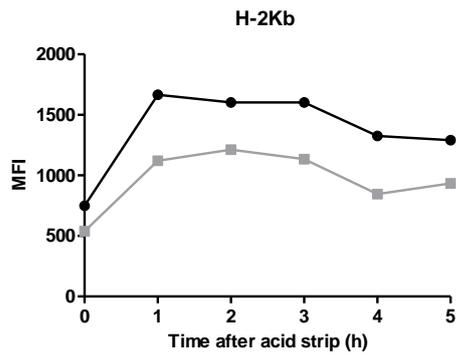
(A) Fréquence d'expression de la molécule H-2K<sup>b</sup> à la surface des MCA205.

(B) Fréquence d'expression de la molécule H-2K<sup>b</sup> à la surface des B16F10.

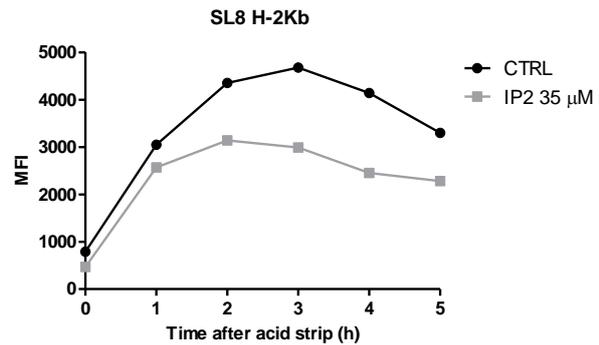
Nous avons par la suite étudié l'effet d'IP2 sur la cinétique d'export des molécules de CMH-I à la surface cellulaire. Les cellules MCA205 ont été traitées avec IP2 à 35µM pendant 18h puis leur surface a été décapée dans un tampon acide pour éliminer toutes les molécules de CMH-I présentées. Le retour des molécules H-2K<sup>b</sup> à la surface cellulaire a été mesuré en cytométrie en flux en ciblant directement les molécules H-2K<sup>b</sup> (**Figure 22A**) ou en ciblant le complexe SL8/H-2K<sup>b</sup> après ajout de SL8 extracellulaire (**Figure 22B**). Cette expérience permet de mesurer de manière indirecte l'effet d'IP2 sur la génération de ligands pour la voie de présentation par le CMH-I car seuls les complexes peptide-CMH-I sont stables à la surface cellulaire à 37°C (Ljunggren et al., 1990).

Nous avons observé qu'IP2 n'avait pas d'effet pendant la première heure sur le retour des molécules de classe I à la surface cellulaire. Un état stable est atteint une à deux heures après le traitement acide et IP2 affecte peu cet état. Cette expérience confirme que l'augmentation de la présentation antigénique observée avec IP2 ne résulte ni d'une augmentation de la vitesse d'export des complexes peptide-CMH-I ni du nombre de molécules H-2K<sup>b</sup> à la surface cellulaire.

(A)



(B)



**Figure 22: Effet d'IP2 sur la cinétique de retour des molécules H-2K<sup>b</sup> à la surface des cellules MCA205.**

(A) Détection par l'anticorps PE-anti H-2K<sup>b</sup>.

(B) Détection par l'anticorps PE-anti SIINFEKL lié au H-2K<sup>b</sup> après ajout de SIINFEKL extracellulaire.

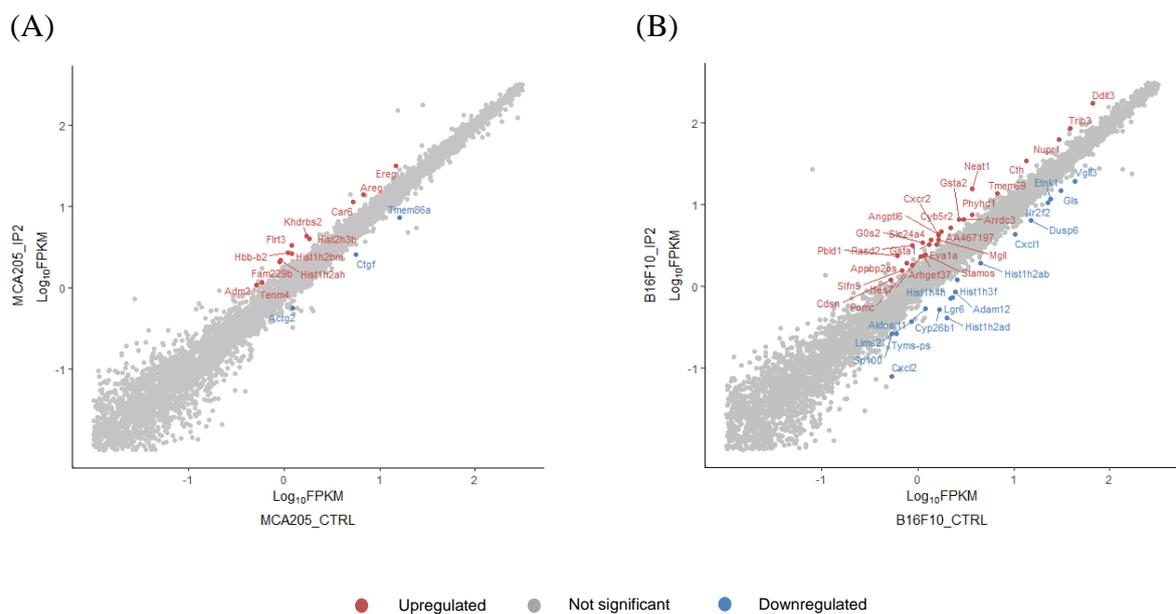
### 2.3 IP2 et l'isoginkgetine ont des activités proches mais non identiques

Le composé IP2 a été synthétisé à partir de l'inhibiteur de l'épissage isoginkgetine et nous avons montré que les deux molécules augmentent la présentation des antigènes dérivés des PTPs. Cependant, d'autres propriétés de l'isoginkgetine ont été décrites dans la littérature. L'isoginkgetine inhibe par exemple la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et induit l'expression de TIMP1, l'inhibiteur de la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9). Cet effet se traduit par une inhibition de MMP9 dans les cellules de fibrosarcomes humains ce qui limite leur caractère invasif (Yoon et al., 2006). Plus récemment, il a été montré que l'isoginkgetine inhibe l'activité de la particule 20S du protéasome ce qui entraîne une accumulation toxique de protéines ubiquitylées dans le réticulum endoplasmique et l'apoptose des cellules (Tsalikis et al., 2019).

Nous avons donc cherché à affiner nos connaissances sur le mécanisme d'action d'IP2 et à identifier les différences éventuelles d'activité avec la molécule isoginkgetine parentale. Pour ce faire, nous avons procédé à une analyse de l'expression différentielle du transcriptome pour identifier les gènes dont l'expression est impactée par le traitement avec IP2. En

comparaison, nous avons procédé à la même analyse pour la molécule d'isoginkgetine parentale. Des cellules MCA205 et B16F10 ont été traitées avec l'isoginkgetine à 15  $\mu$ M ou IP2 à 35  $\mu$ M pendant 18h puis les ARNs ont été extraits, purifiés et séquencés sur Illumina. Les diagrammes de dispersion ci-après représentent les variations induites par IP2 sur le transcriptome des cellules MCA205 (**Figure 23A**) et des cellules B16F10 (**Figure 23B**).

Après traitement avec IP2, nous avons identifié une variation d'expression de 15 gènes dans les cellules MCA205 et 44 gènes dans les cellules B16F10 remplissant les critères suivants : (i)  $p$  value  $\leq 0,05$  ; (ii) FPKM  $\geq 0,5$  dans la condition contrôle ; (iii)  $|FC| \geq 2$ . Les points rouges représentent les gènes dont l'expression est significativement augmentée après traitement avec IP2 alors que les points bleus représentent les gènes dont l'expression est significativement diminuée. On notera que le traitement avec IP2 affecte l'expression de gènes codant pour des histones à la fois dans les MCA205 et les B16F10, mais de manières opposées.



**Figure 23: Analyse différentielle de l'expression des gènes après traitement avec IP2.**

(A) Diagramme de dispersion des gènes affectés par IP2 dans les MCA205.

(B) Diagramme de dispersion des gènes affectés par IP2 dans les B16F10.

Parmi les 12 gènes dont l'expression augmente significativement après traitement avec IP2 dans les cellules MCA205 on retrouve Hist1h2bm, Hist2h3b et Hist1h2ah qui codent pour les histones H2B type 1-M, H3.2 et H2A type 1-H, respectivement (**Figure 23A**). Les histones

jouent un rôle important dans la régulation de la transcription. Parmi les voies biologiques référencées sur Reactome dans lesquelles sont impliquées ces histones on soulignera les interactions avec des enzymes de déubiquitinylation (DUBs) telles que les métalloprotéases. L'expression des gènes codant pour l'amphiréguline (Areg) et l'épiréguline (Ereg) augmentent également après traitement avec IP2 (**Figure 23A**). Areg et Ereg sont deux ligands de l'EGFR. Ils ont notamment été décrits comme des biomarqueurs prédictifs de la réponse des patients atteints de cancer colorectal aux anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR (e.g. bevacizumab) (Seligmann et al., 2016; Stintzing et al., 2018).

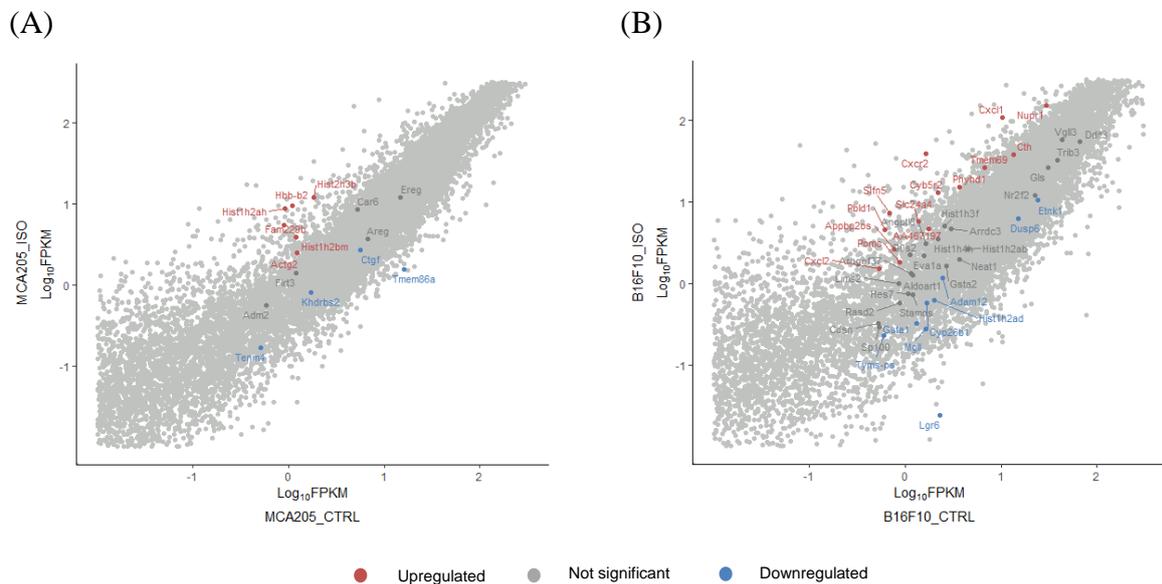
Parmi les gènes dont l'expression est significativement régulée par le traitement avec IP2 dans les cellules B16F10 on retrouve à nouveau des gènes codant pour des histones. Les gènes Hist1h4h, Hist1h2ab, Hist1h3f et Hist1h2ad codent pour les histones H4, H2A type 1-B, H3.1 et H2A, respectivement. De façon surprenante, l'expression de ces quatre gènes est significativement diminuée dans les B16F10 (**Figure 23B**). Par ailleurs, on notera qu'IP2 régule positivement le gène codant pour le récepteur CXCR2 mais négativement les gènes codant pour deux de ses ligands CXCL1 et CXCL2 (**Figure 23B**). Les chimiokines CXCL1 et CXCL2 sont fortement protumorales, elles promeuvent l'angiogenèse et la dissémination des mélanomes et participent au recrutement des MDSCs et des TANs immunosuppresseurs dans la tumeur (Dhawan and Richmond, 2002; Jablonska et al., 2014; Shi et al., 2018a).

Nous avons ensuite voulu savoir si les variations significatives d'expression des gènes induites par IP2 dans les MCA205 et les B16F10 étaient partagées avec l'isoginkgetine parentale. Il apparaît déjà clairement que l'isoginkgetine affecte l'expression d'un très grand nombre de gènes en comparaison avec le dérivé IP2 (**Figure 24**). Plus précisément, après traitement avec l'isoginkgetine nous avons identifié une variation significative d'expression pour plus de 3100 gènes dans les MCA205 (contre 15 avec IP2) et plus de 4400 gènes dans les B16F10 (contre 44 avec IP2). Nous avons annoté uniquement les gènes significativement régulés par IP2 dans les MCA205 (**Figure 24A**) et dans les cellules B16F10 (**Figure 24B**) pour observer leur variation après traitement avec l'isoginkgetine parentale. Parmi les 12 gènes positivement régulés par IP2, 5 le sont également par l'isoginkgetine. On retrouve dans ces derniers les 4 gènes codant pour des histones. En revanche, contrairement à IP2, l'isoginkgetine ne régule pas de manière significative les gènes de l'amphiréguline et de l'épiréguline. Par ailleurs, 2 des 3 gènes régulés négativement par IP2 sont également régulés négativement par l'isoginkgetine. Dans les cellules B16F10, 18 des 44 gènes

significativement régulés par IP2 le sont aussi par l'isoginkgetine dans le même sens. Une seule des 4 histones régulées négativement par IP2 est régulée négativement par l'isoginkgetine. Enfin l'isoginkgetine régule positivement le récepteur CXCR2 mais aussi ses ligands CXCL1 et CXCL2.

On mentionnera par ailleurs que l'isoginkgetine régule positivement l'expression de plus de 80 gènes codant pour des protéines ribosomales (Rpl et Rps) dans les cellules MCA205 comme dans les cellules B16F10 (résultat non présenté). Ces protéines ribosomales sont évidemment impliquées dans la traduction des ARNm mais également dans leur dégradation (NMD).

En définitive, cette première étude de transcriptomique suggère que les mécanismes d'action du dérivé IP2 et de la molécule d'isoginkgetine parentale divergent. Le composé IP2 affecte l'expression d'un nombre très réduit de gènes comparé à l'isoginkgetine, ce qui peut expliquer la différence de cytotoxicité observée entre les deux composés (voir 2.1 IP2 n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules tumorales).



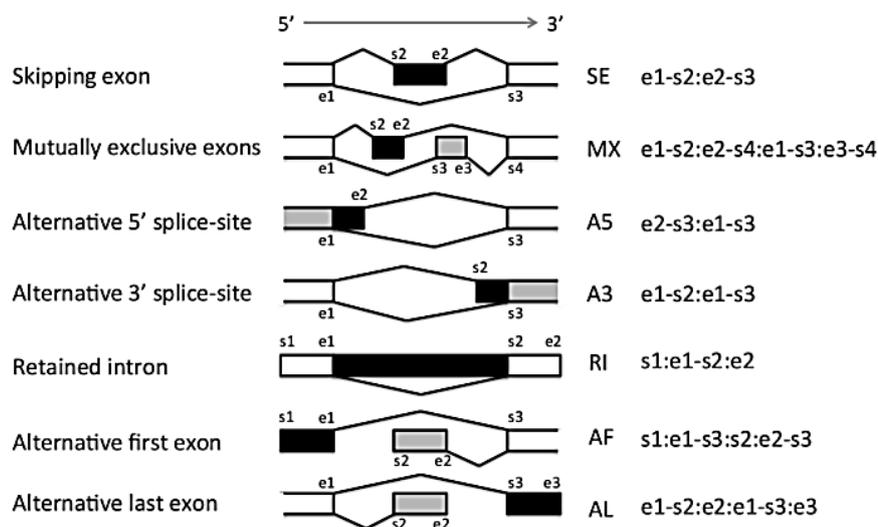
**Figure 24: Analyse différentielle de l'expression des gènes après traitement avec l'isoginkgetine.**

(A) Diagramme de dispersion des gènes affectés par l'isoginkgetine dans les MCA205.

(B) Diagramme de dispersion des gènes affectés par l'isoginkgetine dans les B16F10.

Nous avons continué à exploiter les données de transcriptomique et nous nous sommes plus

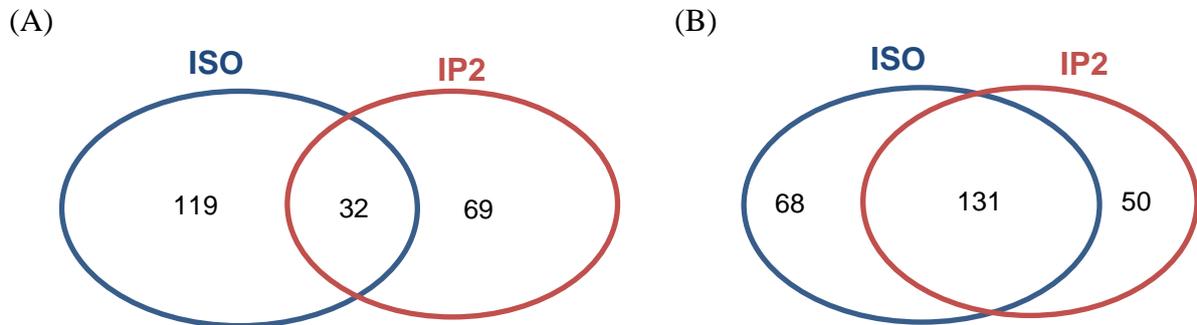
particulièrement intéressés à l'effet du composé IP2 et de la molécule d'isoginkgetine parentale sur l'épissage des ARN. A partir des résultats de RNA-seq, nous avons donc procédé à une analyse différentielle des événements d'épissage alternatif induits par les deux composés en employant la méthode SUPPA2 (Trincado et al., 2018). L'abondance relative d'un événement d'épissage ou d'un transcrit dans une condition est estimée par la fréquence d'inclusion du variant (*percent-spliced-in* ou PSI) calculée comme le ratio entre le nombre de *reads* dans lesquels le variant est inclus sur le nombre de *reads* dans lesquels le variant est exclu. On détermine alors la différence d'abondance relative  $\Delta$ PSI d'un événement ou d'un transcrit entre la condition contrôle et la condition traitée. Nous avons étudié les cinq principaux événements d'épissage alternatifs : le saut d'exon (SE), les exons mutuellement exclusifs (MX), la rétention d'intron (RI), le site d'épissage alternatif en 5' (A5) et le site d'épissage alternatif en 3' (A3), ainsi que deux événements qui participent également de la diversité des ARNm matures : le premier exon alternatif (AF) et le dernier exon alternatif (AL) (**Figure 25**).



**Figure 25: Événements d'épissage alternatifs.**

Tous types d'événement confondus, nous avons observé des similarités d'action entre l'isoginkgetine et IP2 sur les cellules MCA205 et B16F10. Le saut d'exon est l'événement d'épissage le plus fréquent et le plus affecté par le traitement avec l'isoginkgetine ou IP2 (résultat non présenté) (Patthy, 2019). Près de 20% des événements d'épissage alternatifs induits par l'isoginkgetine dans les cellules MCA205 le sont également par le composé IP2

(Figure 26A). Dans les cellules B16F10, cette proportion s'élève à plus de 65% (Figure 26B).



**Figure 26 : Comparaison de l'effet de l'isoginkgetine et d'IP2 sur l'épissage alternatif.**

(A) Nombre d'événements d'épissage alternatifs induits par l'isoginkgetine et IP2 dans les cellules MCA205.

(B) Nombre d'événements d'épissage alternatifs induits par l'isoginkgetine et IP2 dans les cellules B16F10.

On soulignera que l'isoginkgetine et IP2 induisent des événements d'épissage alternatif communs entre les cellules MCA205 et B16F10 au niveau des cinq gènes listés dans le **Tableau 2** ci-après.

**Tableau 2: Evénements d'épissage alternatif induits par l'isoginkgetine et IP2 dans les cellules MCA205 et B16F10.**

Transcript coordinates	Gene	Splicing event
chr10:7649155-7651350:7651536:7649155-7663075:7663608	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	AF
chr12:28675231:28675372-28677778:28675484:28675549-28677778	Acireductone Dioxygenase 1	AF
chr13:49518302:49518490-49520572:49521072	Extracellular Matrix Protein 2	RI
chr4:44995386-45010952:44995386-45012224	Zinc Finger And BTB Domain Containing 5	A5
chr11:33156104-33156664:33156747-33156991	Nucleophosmin 1	SE

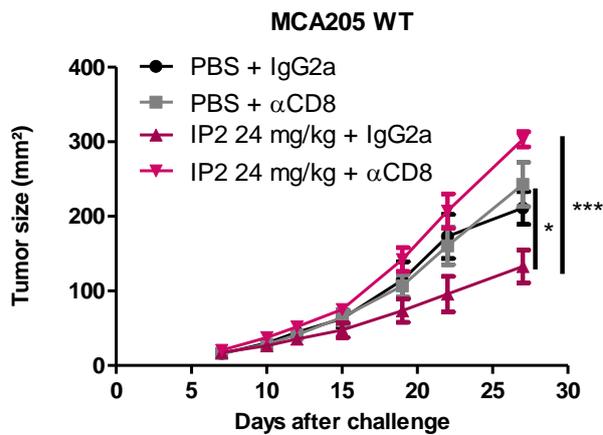
Cette analyse différentielle de l'épissage alternatif corrobore les résultats obtenus au cours de l'analyse différentielle d'expression des gènes : le composé IP2 conserve certaines propriétés de l'isoginkgetine parentale notamment sur l'altération de l'épissage mais chaque molécule semble avoir ses spécificités. Compte tenu des différentes activités de l'isoginkgetine précédemment décrites, nous pouvons faire l'hypothèse que l'effet du composé IP2 est également le résultat de plusieurs activités combinées.

## 2.4 L'effet d'IP2 est dépendant de la réponse immunitaire et des LT CD8<sup>+</sup>

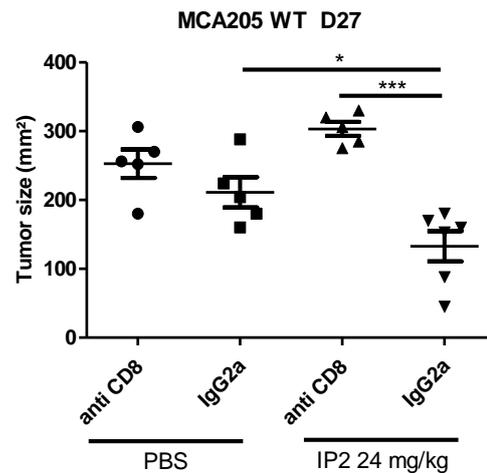
Nous avons observé *in vitro* qu'IP2 régule positivement la présentation antigénique dans les cellules cancéreuses et que cet effet n'est pas lié à une augmentation des molécules du CMH-I à la surface cellulaire. Par ailleurs, l'inhibition de la croissance tumorale observée *in vivo* ne peut pas être attribuée à une activité cytotoxique directe contre les cellules tumorales. La présentation de peptides antigéniques dans des molécules du CMH-I par les cellules tumorales permet leur reconnaissance et leur élimination par les LT CD8<sup>+</sup> acteurs de la réponse immunitaire adaptative. C'est pourquoi, nous faisons l'hypothèse que l'activité antitumorale du composé IP2 est liée à l'augmentation de la présentation antigénique dans les cellules tumorales qui facilite leur reconnaissance par les LT CD8<sup>+</sup>. L'action d'IP2 doit donc reposer sur le système immunitaire.

A. Pierson a déjà montré qu'IP2 n'a aucun effet sur la croissance des tumeurs MCA205 et B16F10 dans des souris nude dépourvues de système immunitaire adaptatif (**Annexe 1**). Pour déterminer le rôle spécifique des LT CD8<sup>+</sup> dans l'activité antitumorale d'IP2, nous avons utilisé un anticorps de déplétion contre les LT CD8<sup>+</sup> *in vivo*. Des souris C57Bl/6 immunocompétentes ont été traitées avec IP2 et l'anticorps de déplétion des LT CD8<sup>+</sup> de manière concomitante. Nous avons observé que l'activité antitumorale d'IP2 était perdue en l'absence de LT CD8<sup>+</sup> viables (**Figure 27**). L'action d'IP2 dépend donc de la réponse T CD8<sup>+</sup>.

(A)



(B)

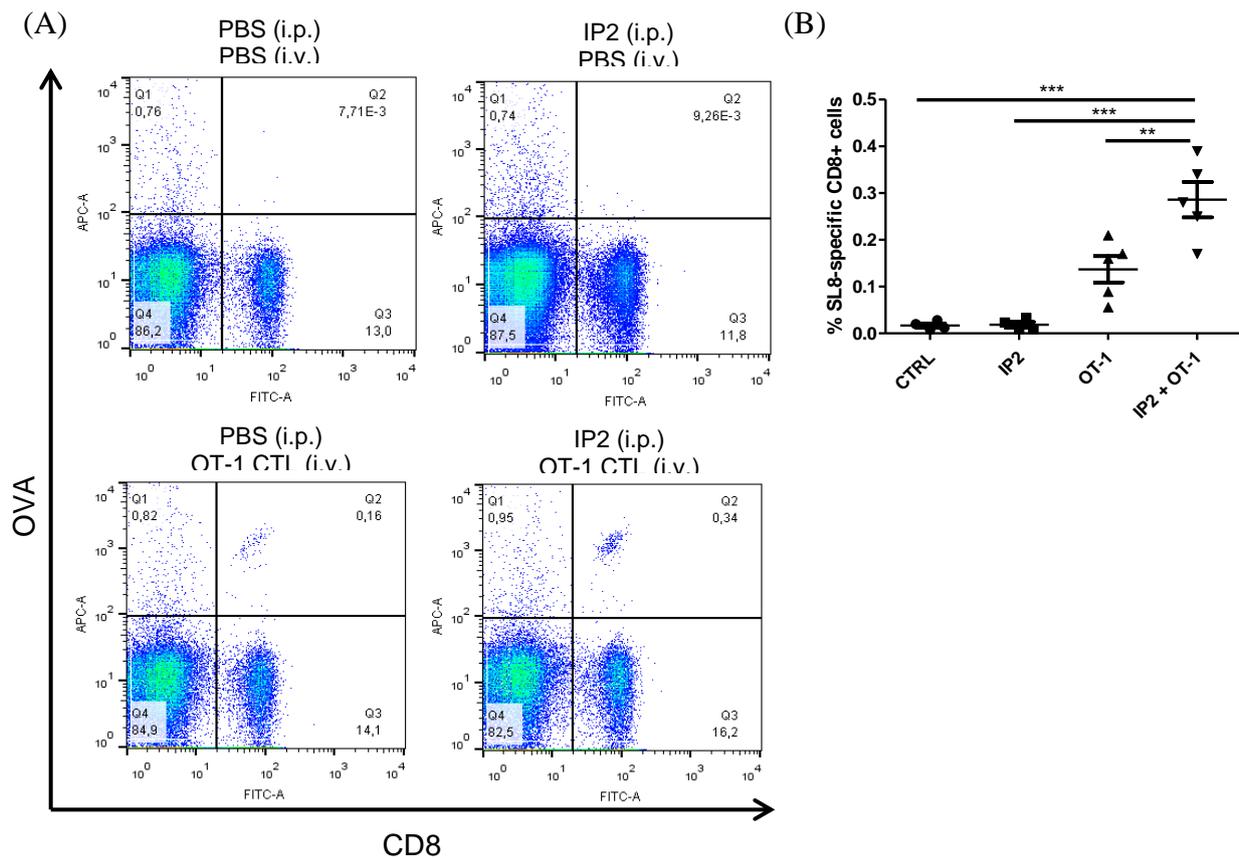


**Figure 27: Effet d'IP2 dans des souris dépourvues de LT CD8<sup>+</sup>.**

(A) Courbes de croissance tumorale des MCA205WT.

(B) Taille des tumeurs MCA205 exprimée en aire (mm<sup>2</sup>) le jour du sacrifice.

Nous avons ensuite voulu déterminer l'effet du traitement avec IP2 sur la population de LT CD8<sup>+</sup> chez la souris. Nous avons pour cela utilisé le modèle OT-1 de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'épitope SIINFEKL de l'ovalbumine (OVA<sub>257-264</sub>). Nous avons inoculé des cellules MCA205 globin-SL8-intron exprimant l'épitope SIINFEKL en position intronique à des C57BL/6 que nous avons ensuite traitées à deux reprises avec le composé IP2 à 24 mg/kg en intrapéritonéal (i.p.) avant de leur administrer des cellules T CD8<sup>+</sup> OT-1 en intraveineuse (i.v.). Trois jours après le transfert adoptif des cellules T CD8<sup>+</sup> OT-1, leur prolifération est estimée en cytométrie en flux. Les cellules sont marquées avec un dextramère greffé de dix complexes SIINFEKL/H-2K<sup>b</sup> et couplé à un fluorochrome APC, puis avec un anticorps anti-CD8. Ce marquage nous permet de détecter les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du SIINFEKL parmi les splénocytes récoltés. Nous avons détecté des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du SIINFEKL uniquement dans les rates des souris ayant reçu des cellules T CD8<sup>+</sup> OT-1 par transfert adoptif (**Figure 28A**). Parmi ces souris, nous avons observé un pourcentage deux fois plus important de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du SIINFEKL chez celles qui avaient été traitées avec IP2 (**Figure 28B**). Nous concluons donc que le traitement avec IP2 induit la prolifération de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques des antigènes présentés par la cellule tumorale.



**Figure 28: Effet d'IP2 sur la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> OT-1.**

(A) Représentation graphique des populations.

(B) Proportion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du SIINFEKL.

L'effet antitumoral d'IP2 sur la croissance des MCA205 globin-SL8-intron et des B16F10 globin-SL8-intron *in vivo* résulte donc de la prolifération de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'épitope SIINFEKL. L'effet antitumoral d'IP2 sur ces modèles tumoraux est fort car l'épitope SIINFEKL est très immunogène (Röttschke et al., 1991 ; %Rank 0.06 sur NetMHC 4.0). Dans le cas des MCA205 WT et des B16F10 WT, nous faisons l'hypothèse qu'IP2 augmente la présentation de peptides antigéniques immunogènes endogènes qui sont reconnus par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques. Dans la suite du projet, nous avons cherché à identifier ces peptides immunogènes présentés dans des molécules du CMH-I à la surface cellulaire des MCA205 WT et des B16F10 WT et dont l'expression est augmentée après traitement avec IP2.

### **3. Effet d'IP2 sur l'immunopeptidome du CMH I**

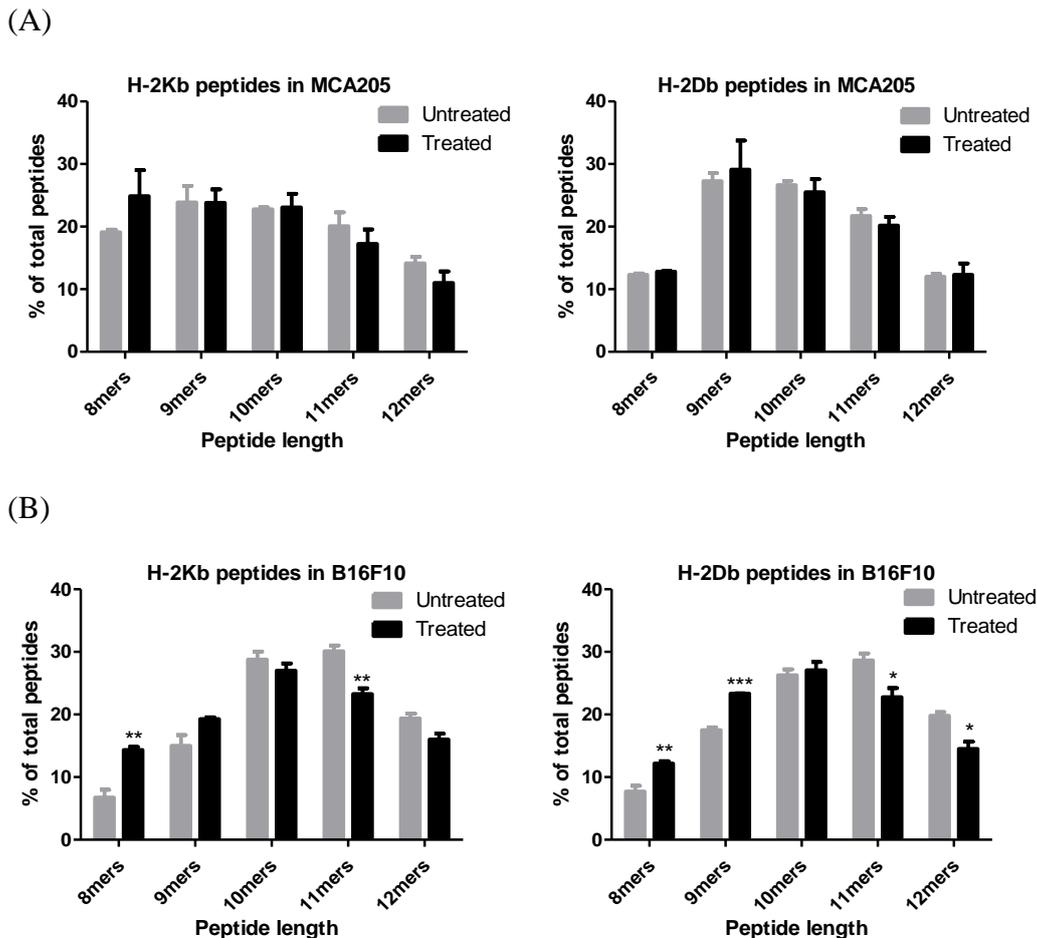
Nous avons observé que l'effet d'IP2 est dépendant du système immunitaire et que le traitement induit la prolifération d'une population de LT CD8+ réactive contre un épitope immunogène exprimé à partir d'un intron. Nous avons alors fait l'hypothèse qu'IP2 pouvait modifier l'immunopeptidome des cellules tumorales et nous nous sommes particulièrement intéressés aux modifications du répertoire de peptides présentés dans les molécules H-2Kb et H-2Db du CMH-I murin. Nous avons procédé à l'immunoprécipitation de ces molécules à la surface de cellules MCA205 et B16F10 traitées ou non avec IP2. Les peptides ont ensuite été élués en milieu acide et purifiés avant d'être caractérisés par spectrométrie de masse. L'enjeu majeur de cette étude était la construction d'une base de données nous permettant d'identifier des peptides non-conventionnels dérivés de séquences introniques, de séquences UTR ou de jonctions exons-introns qui ne sont pas accessibles dans les bases de données publiques de protéomique. Pour chaque lignée cellulaire, MCA205 et B16F10, nous avons donc construit notre propre base de données « All frame » en traduisant les « reads » de RNA-seq dans les six cadres de lecture (trois pour chaque brin). Cette base de données a été construite par M. Rouillon dans le cadre d'un projet financé par la SATT Paris Saclay et fait l'objet d'une clause de confidentialité. Les étapes de sa construction ne pourront donc pas être présentées. Nous nous sommes également intéressés plus particulièrement aux épitopes générés à partir d'événements de rétention d'introns. En effet, l'isoginkgetine et IP2 sont des inhibiteurs de l'épissage qui induisent des rétentions d'introns et ces altérations de l'épissage sont des sources de néoantigènes pour la voie de présentation par le CMH-I (Smart et al., 2018). Nous avons donc construit une base de données « Retained Introns » pour chaque lignée cellulaire en utilisant l'outil « keep me around » (Pimentel et al., 2015) disponible sur la plateforme GitHub. Cette base de données a été concaténée avec le protéome de référence murin disponible sur Uniprot pour former les bases « Retained Introns + Uniprot ».

#### **3.1 IP2 modifie la présentation d'épitopes conventionnels et non-conventionnels**

La démarche de protéogénomique que nous avons mise en place nous a permis d'identifier des peptides dont l'expression est affectée par le traitement avec IP2. Après identification des séquences peptidiques en LC-MS/MS, nous avons pu retrouver l'origine de ces peptides en

remontant aux données de RNA-seq et en alignant chaque « read » sur le génome murin GRCm38.p6 avec Ensembl. Pour chaque échantillon, nous avons listé tous les peptides de 8 à 12 acides aminés retrouvés à la surface cellulaire avec un FDR<5%.

D'un point de vue qualitatif, nous avons tout d'abord observé que 2% des peptides présentés à la surface cellulaire étaient communs entre les MCA205 et les B16F10 et que cette proportion ne changeait pas après traitement avec IP2. De plus, les cellules traitées et les cellules non traitées partagent 30% de peptides communs suggérant qu'environ 70% de l'immunopeptidome du CMH-I est affecté par le traitement avec IP2. Cette proportion est valable pour les peptides présentés dans les molécules H-2K<sup>b</sup> comme pour ceux présentés dans les molécules H-2D<sup>b</sup>, à la surface des MCA205 comme à la surface des B16F10. Nous avons ensuite observé la distribution par taille des peptides présentés à la surface cellulaire et avons noté un enrichissement en peptides courts (8 ou 9 acides aminés) au détriment des peptides de plus de 11 acides aminés (**Figure 29**).



**Figure 29: Longueur des peptides présentés à la surface cellulaire après traitement avec IP2.**

(A) Longueur des peptides présentés à la surface des MCA205 dans les molécules H-2K<sup>b</sup> (à gauche) et dans les molécules H-2D<sup>b</sup> (à droite).

(B) Longueur des peptides présentés à la surface des B16F10 dans les molécules H-2K<sup>b</sup> (à gauche) et dans les molécules H-2D<sup>b</sup> (à droite).

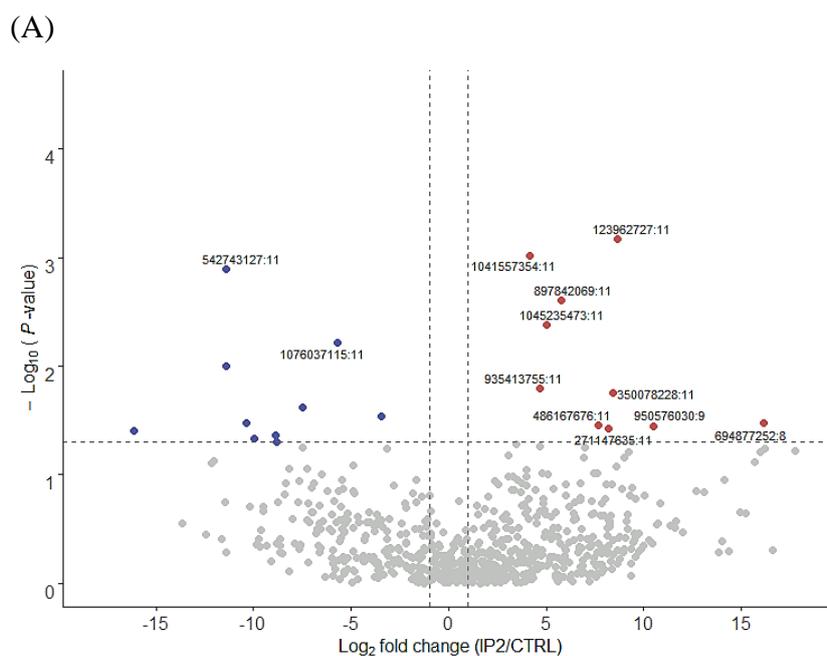
Nous avons ensuite procédé à une analyse quantitative des variations induites par IP2 sur le répertoire des peptides présentés dans les molécules H-2K<sup>b</sup> et H-2D<sup>b</sup> à la surface des cellules MCA205 et B16F10. Les variations observées sur chacune des bases de données au niveau de l'immunopeptidome du CMH-I après traitement avec IP2 sont représentées dans les diagrammes de dispersion de type *volcano plot* et listées dans les tableaux ci-après (**Figure 30 à 37**). Sur les diagrammes de dispersion, les peptides dont l'expression a augmenté d'au moins un facteur 2 avec une ANOVA  $p \leq 0,05$  après traitement avec IP2 sont représentés par un point rouge et annotés. Les points bleus représentent les peptides dont l'expression a diminué d'au moins un facteur 2 avec une ANOVA  $p \leq 0,05$  après traitement avec IP2 mais pour une question de lisibilité des graphiques seuls les peptides dont l'expression a diminué

d'au moins un facteur deux avec une ANOVA  $p \leq 0,01$  après traitement avec IP2 sont annotés. A chaque diagramme de dispersion est associé un tableau qui contient :

- Le numéro d'accension du peptide dans la base de données correspondante. Pour les bases de données « Retained Introns » le numéro d'accension correspond aux coordonnées de l'intron sur le chromosome (chr) correspondant.
- La séquence de l'épitope avec en gras les mutations ponctuelles observées par rapport au protéome de référence.

*ex* : WVLQTDSSQQ**G**/StopA. Une mutation ponctuelle d'un nucléotide (ici **A/C**) en position 11:94643539 du gène *Lrrc59* chez les MCA205 conduit à la traduction du codon correspondant en Glycine (**G**) au lieu d'un codon **Stop**. Cet épitope est donc un néoantigène des MCA205 enrichi après traitement avec IP2.

- L'ordre de grandeur de la variation d'expression (ou FC pour *Fold Change*) en valeur absolue.
- Le gène dont dérive l'épitope.
- La région du génome dont dérive l'épitope. Par définition les épitopes identifiés sur la base « Retained Introns » dérivent d'un intron retenu et les épitopes identifiés sur le protéome de référence Uniprot dérivent d'un exon.
- La description de l'épitope dans l'*Immune Epitope Database* (IEDB). *Novel* signifie que l'épitope n'est pas référencé dans l'IEDB et que par conséquent notre étude constitue la première mise en évidence expérimentale connue de cet épitope à la surface d'une cellule. IEDB\* signifie que l'épitope est référencé dans l'IEDB sous une forme plus courte ou plus longue.



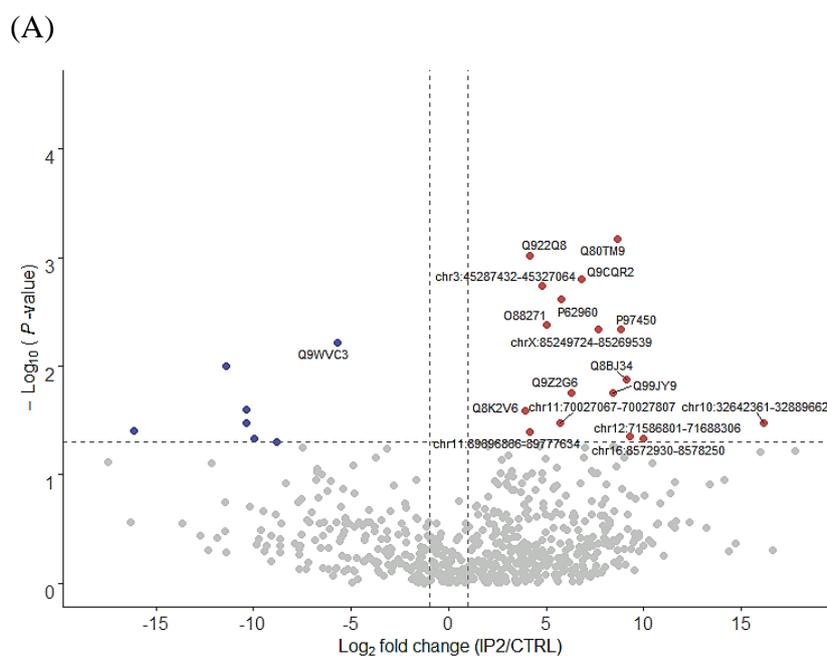
(B)

Accession number	Sequence	FC	Gene	Region	Description
1041557354:11	WVLQTD <b>S</b> QQ <b>G</b> /StopA	>10	Leucine Rich Repeat Containing 59	Exon	Novel
935413755:11	TPSGLQTS <b>A</b> F <b>E</b>		Bone Morphogenetic Protein 1	Intron	Novel
1045235473:11	KV <b>F</b> DFAG <b>E</b> EEV		Craniofacial Development Protein 1	Exon	IEDB
1076037115:11	YVMYK <b>F</b> L <b>T</b> V <b>C</b> /FL		Caveolin-2	Exon	IEDB*
897842069:11	SYWY <b>W</b> TYKE <b>W</b> E		Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 7	Exon	Novel
486167676:11	LL <b>F</b> LLHR <b>H</b> TV	>100	Pyrophosphatase (Inorganic) 2	Intron	Novel
271147635:11	GRI <b>W</b> EELE <b>E</b> V <b>G</b> D		Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family B Member 2	Intron	Novel
350078228:11	<b>I</b> ML <b>A</b> STPEFY <b>Q</b> V		Actin Related Protein 3	Exon	IEDB*
123962727:11	T <b>N</b> QDF <b>I</b> Q <b>R</b> L		Nischarin	Exon	IEDB
950576030:9	TT <b>Q</b> RD <b>P</b> S <b>M</b> L	>1000	n.d.	Enhancer	Novel
542743127:11	L <b>H</b> FT <b>G</b> IE <b>D</b>		Protein Kinase C Alpha	Intron	Novel
694877252:8	Q <b>I</b> L <b>M</b> L <b>K</b> T <b>L</b>		PPARG Coactivator 1 Alpha	Intron	Novel

**Figure 30: Variations des peptides H-2K<sup>b</sup> observées sur la base MCA205 « All frame ».**

(A) Diagramme de dispersion des peptides dont la présentation varie après traitement avec IP2.

(B) Liste des peptides dont la présentation varie significativement après traitement avec IP2.



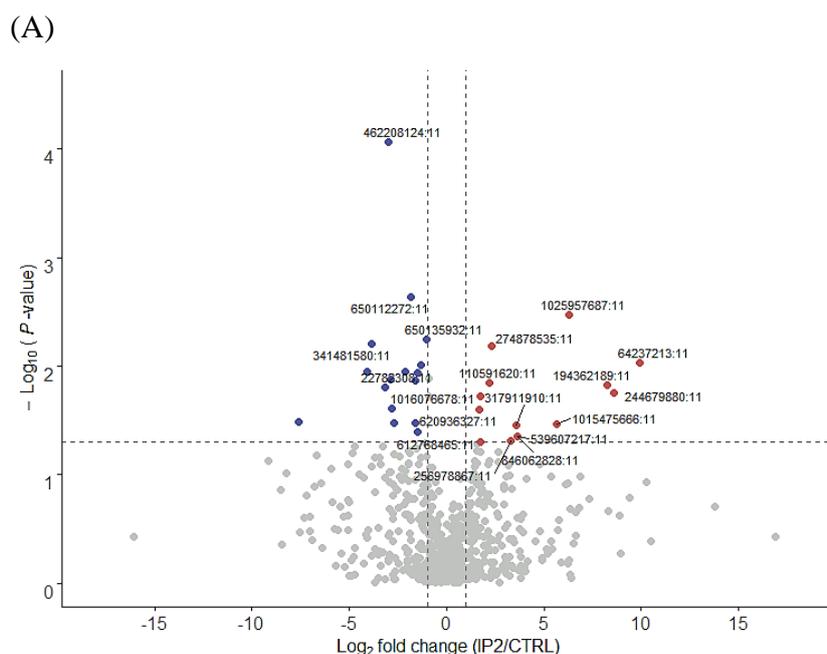
(B)

Accession number	Sequence	FC	Gene	Description
Q8K2V6	TIILFTKV	>10	Importin-11	IEDB
Q922Q8	WVLQTDSSQ		Leucine-rich repeat-containing protein	Novel
chr11:89696866-89777634	LSPIPTAQRSLA		Ankyrin Repeat and Fibronectin Type III Domain Containing 1	Novel
chr3:45287432-45327064	MAYLRAKQN		LncRNA 2610316D01	Novel
O88271	KVDFDAGEEV		Craniofacial development protein 1	IEDB
Q9WVC3	VMYKFLTV		Caveolin-2	IEDB
chr11:70027067-70027807	ETLAAPSPVRPS		Discs Large MAGUK Scaffold Protein 4	Novel
P62960	TVKWFNVRNGYG		Nuclease-sensitive element-binding protein 1	IEDB*
Q9Z2G6	QALKYFNL		Protein sel-1 homolog 1	IEDB
Q9CQR2	LAKADGIVSKNF		40S ribosomal protein S21	IEDB
chrX:85249724-85269539	ILEHLLVLCRLT	>100	Ferritin, heavy polypeptide-like 17, member A	Novel
Q99JY9	STPEFYQV		Actin-related protein 3	IEDB
Q80TM9	TNQDFIQRL		Nischarin	IEDB
P97450	DPKFEVIDKPQS		ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	IEDB
Q8BJ34	LLELLEAIEIIL		Meiosis arrest female protein 1	Novel
chr12:71586801-71688306	ALNHKLMY		LncRNA 9630002D21	Novel
chr16:8572930-8578250	SSLLLLLEIV		4-Aminobutyrate Aminotransferase	Novel
chr10:32642361-32889662	LQLMLKTI	>1000	Sodium/Potassium Transporting ATPase Interacting 2	Novel

**Figure 31: Variations des peptides H-2K<sup>b</sup> observées sur la base MCA205 « Retained Introns + Uniprot ».**

(A) Diagramme de dispersion des peptides dont la présentation varie après traitement avec IP2.

(B) Liste des peptides dont la présentation varie significativement après traitement avec IP2.



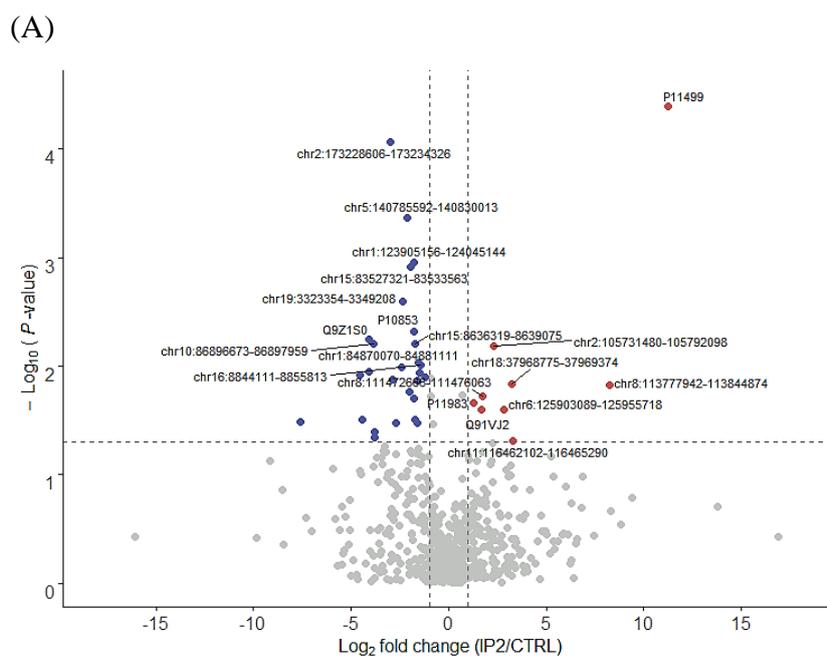
(B)

Accession number	Sequence	FC	Gene	Region	Description
650135932:11	PPKKKGGIP	>2	Coiled-Coil Domain Containing 88C	Intron	Novel
22782308:11	AKLHFLV <b>G</b> HITIL		LUC7 Like 2, Pre-mRNA Splicing Factor	Intron	Novel
620936327:11	PEKARPLL <b>T</b> QE		Ribosomal Protein S8	Intron	Novel
1016076678:11	VV <b>K</b> LVI <b>P</b> PW		WD Repeat Domain 59	Intron	Novel
612768465:11	PALARVASE <b>P</b> A		Proline Rich 3	Exon	Novel
650112272:11	PP <b>K</b> GL <b>G</b> PVLH		A-Kinase Anchoring Protein 1	Exon	Novel
110591620:11	DL <b>A</b> T <b>I</b> NVYVD <b>V</b> /A <b>L</b> / <b>V</b> K		Apolipoprotein A1	Exon	Novel
274878535:11	G <b>S</b> CR <b>S</b> CC <b>R</b> Q <b>V</b>		Myelin Expression Factor 2	Exon	Novel
462208124:11	LG <b>F</b> L <b>A</b> /P <b>G</b> AV <b>V</b> T <b>F</b>		High mobility group AT-hook 1	Exon	Novel
256978867:11	GLR <b>D</b> P <b>F</b> L <b>T</b> P		Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator Like 1	Intron	Novel
317911910:11	HRL <b>V</b> E <b>K</b> E <b>F</b> R <b>I</b> R		Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 23	Intron	Novel
539607217:11	T <b>G</b> T <b>K</b> H <b>A</b> N <b>I</b> C	Peroxisomal Trans-2-Enoyl-CoA Reductase	Intron	Novel	
846062828:11	S <b>M</b> D <b>S</b> K <b>S</b> S <b>G</b> W <b>G</b> M	TAR DNA Binding Protein	Exon	IEDB	
341481580:11	I <b>G</b> P <b>R</b> R <b>P</b> V <b>H</b>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit D	Intron	Novel	
1015475666:11	<b>V</b> /L <b>V</b> F <b>S</b> N <b>V</b> N <b>L</b> K <b>E</b> V	Damage Specific DNA Binding Protein 1	Exon	IEDB*	
1025957687:11	W <b>F</b> I <b>N</b> K <b>S</b> P <b>W</b> F <b>T</b> T <b>L</b>	Karyopherin Subunit Alpha 1	Intron	Novel	
194362189:11	<b>F</b> L <b>I</b> M <b>K</b> /S <b>t</b> o <b>p</b> PL <b>H</b> R <b>Q</b> I	Mitochondrial Trans-2-Enoyl-CoA Reductase	Intron	Novel	
244679880:11	<b>G</b> H <b>L</b> /P <b>S</b> Y <b>L</b> V <b>V</b> E <b>E</b>	Dystrobrevin Binding Protein 1	Intron	Novel	
64237213:11	<b>C</b> F <b>C</b> /F <b>P</b> E <b>V</b> Q <b>T</b> Y <b>F</b> S	Trafficking Kinesin Protein 2	Intron	Novel	

**Figure 32: Variations des peptides H-2D<sup>b</sup> observées sur la base MCA205 « All Frame ».**

(A) Diagramme de dispersion des peptides dont la présentation varie après traitement avec IP2.

(B) Liste des peptides dont la présentation varie significativement après traitement avec IP2.



(B)

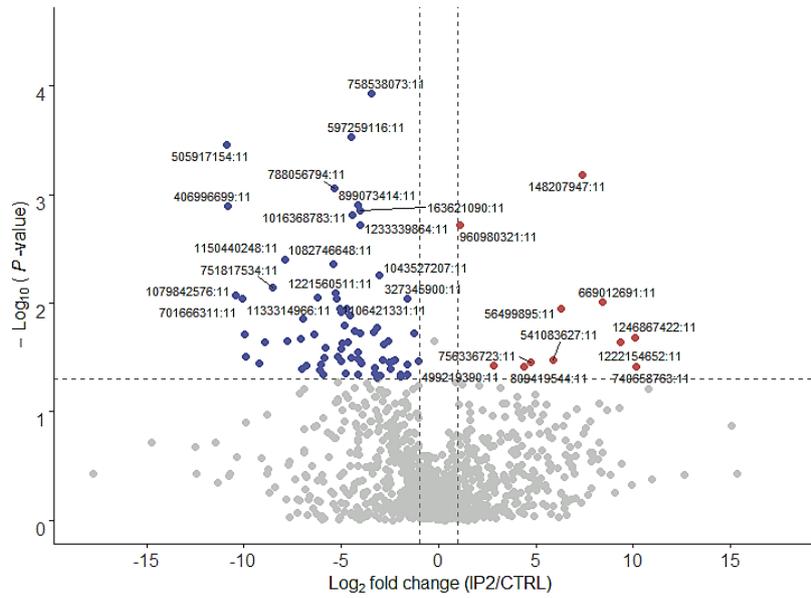
Accession number	Sequence	FC	Gene	Description
P11983	VRYINENL	>2	T-complex protein 1 subunit alpha	IEDB
chr16:8844111-8855813	TLVRTPPPTK		RIKEN cDNA 1810013L24 gene	Novel
chr1:84870070-84881111	VGKTALPKVRS		F-box protein 36	Novel
Q91VJ2	PEKPVLQIESAA		Protein kinase C delta-binding protein	Novel
chr15:8636319-8639075	GLPPITVR		Solute carrier family 1 member 3	Novel
chr8:111472666-111476063	VVKLVIPPW		WD repeat domain 59	Novel
chr1:123905156-124045144	QLVTFREL		Dipeptidylpeptidase 10	Novel
P10853	SVYVYKVL		Histone H2B type 1-F/J/L	IEDB
chr15:83527321-83533563	LGVATRKPAAGL		BCL2-interacting killer	Novel
chr5:140785592-140830013	PLRDPVSKLKQ		Guanine nucleotide binding protein, alpha 12	Novel
chr2:105731480-105792098	VFWCNSDEV		Elongator acetyltransferase complex subunit 4	Novel
chr19:3323354-3349208	DPVVTKPAGLI		Carnitine palmitoyltransferase 1a	Novel
chr6:125903089-125955718	AELQNLPTCGQ		Anoctamin 2	Novel
chr2:173228606-173234326	GLFLAGLGIS		Prostate transmembrane protein, androgen induced 1	Novel
chr18:37968775-37969374	GVGGSWCWGSEQ		FCH and double SH3 domains 1	Novel
chr11:116462102-116465290	GLGSGKWTPPL		Glutamine rich 2	Novel
chr10:86896673-86897959	AVPRPRHV		>10	Stabilin 2
Q9Z1S0	AIITGFRNV	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta		IEDB
chr8:113777942-113844874	LFQFEILIFI	>100	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 18	Novel
P11499	DEDASRMEEVD	>1000	Heat shock protein	IEDB

**Figure 33: Variations des peptides H-2D<sup>b</sup> observées sur la base MCA205 « Retained Introns + Uniprot ».**

(A) Diagramme de dispersion des peptides dont la présentation varie après traitement avec IP2.

(B) Liste des peptides dont la présentation varie significativement après traitement avec IP2.

(A)



(B)

Accession number	Sequence	FC	Gene	Region	Description
960980321:11	SIVPHT/RRPHPP	>2	AT-Rich Interaction Domain 1B	Intron	Novel
327345900:11	GTIVFPTWIVF		SRY (sex determining region Y)-box 5	Intron	Novel
499219390:11	KTMKLGALLG		Trimethyllysine Hydroxylase, Epsilon	Intron	Novel
1043527207:11	ALPSRPTYK		Transmembrane protein, adipocyte associated 1	Intron	Novel
758538073:11	PPPTKGQQTSS	>10	Discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	Intron	Novel
163621090:11	IPAPGKQGRR		Jpx transcript, Xist activator	lncRNA	Novel
1233339864:11	YLLLSWPQRSL		Rap guanine nucleotide exchange factor 4	Intron	Novel
899073414:11	RRRREGRKIMR		Neuron navigator 3	Intron	Novel
809419544:11	KQDPNSKHPEC		Signal Transducing Adaptor Molecule	Intron	Novel
1016368783:11	SQAQIGKRDS		Tyrosinase-related protein 1	Intron	Novel
597259116:11	PVRSVQSHSM		PTPRF Interacting Protein Alpha 1	Intron	Novel
756336723:11	PPHLPQRHVF		n.d.	Intergenic DNA	Novel
1106421331:11	TVLTSIQLTFV		S phase cyclin A-associated protein in the ER	Intron	Novel
1221560511:11	EKLGLISTFV		Coiled-coil domain containing 173	Intron	Novel
788056794:11	PWSQHYHQGY		Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Intron	Novel
1082746648:11	ARDLAKKF		Ribosomal protein S6 kinase beta-2	Exon	Novel
541083627:11	GLDNAGKTTI		GTP-binding protein SAR1a	Exon	IEDB
1133314966:11	VHAVKWKMSVF		HAUS augmin-like complex, subunit 6	Exon	Novel
56499895:11	ATHSSRF/IPLK		40S ribosomal Protein S15	Exon	Novel
148207947:11	EANDLNV/FLY		Ubiquitin Specific Peptidase 47	Intron	Novel
1150440248:11	VLVTQPSNPNA		Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14	Intron	Novel
669012691:11	MVKL/HQLRLAQF		Transmembrane Protein 199	Exon	Novel
751817534:11	PMDLKFARIW		RAD51 paralog B	Intron	Novel
1222154652:11	YFCFYMYD	LUC7 Like 2, Pre-mRNA Splicing Factor	Intron	Novel	
701666311:11	NSFPIETRDPS	Plexin B1	Exon	Novel	
1246867422:11	YTLFYNIYI	Discs Large MAGUK Scaffold Protein 3	Exon	Novel	

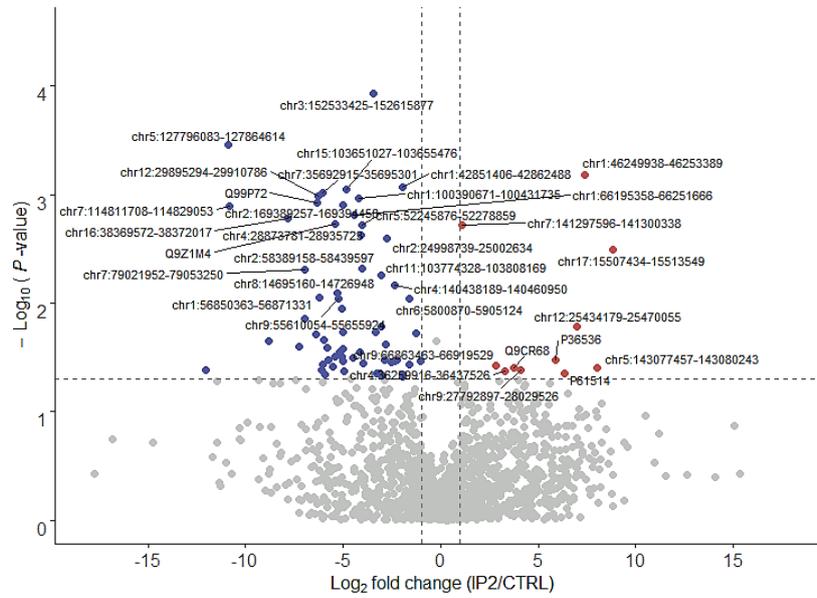
740658763:11	PKDPM <b>R</b> RDPEEL		Oxysterol Binding Protein Like 5	Exon	Novel
1079842576:11	VKVG <b>V</b> NGFG		Aging-associated gene 9	Exon	IEDB
406996699:11	LDPKIKPD		INSC spindle orientation adaptor protein	Intron	Novel
505917154:11	KYGKVFGLF <b>V</b> F <b>V</b>		NOP58 ribonucleoprotein	Intron	Novel

**Figure 34: Variations des peptides H-2K<sup>b</sup> observées sur la base B16F10 « All Frame ».**

(A) Diagramme de dispersion des peptides dont la présentation varie après traitement avec IP2.

(B) Liste des peptides dont la présentation varie significativement après traitement avec IP2.

(A)



(B)

Accession number	Sequence	FC	Gene	Description
chr7:141297596-141300338	KSTLHHHPAI	>2	DEAF1, transcription factor	Novel
chr6:5800870-5905124	LVASLCPHRRQ		Dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1	Novel
chr1:42851406-42862488	LCIPGGIPSLE		Mitochondrial ribosomal protein S9	Novel
chr4:140438189-140460950	APLTLRAATPL		Predicted gene 13026	Novel
chr2:24998739-25002634	PPSLPPSFLSS		Patatin-like phospholipase domain containing 7	Novel
chr9:66863463-66919529	KTSILCVLIIV		RAB8B, member RAS oncogene family	Novel
chr11:103774328-103808169	GKPSTFVSLP		Wnt Family Member 3	Novel
chr4:36259916-36437526	FASGLPPLLCL		Leucine rich repeat and Ig domain containing 2	Novel
chr3:152533425-152615877	CRKAPHPGYV	>10	Adenylate kinase 5	Novel
Q9CR68	TVGLNVPASVRF		Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	IEDB
chr2:58389158-58439597	LPASGVVIVQP		Activin A receptor, type 1	Novel
chr5:52245876-52278859	TSLITPYPRQSL		RIKEN cDNA 9230114K14 gene	Novel
chr4:28873781-28935723	NVLEGRSD		Eph receptor A7	Novel
chr9:27792897-28029526	EEINPSLTNCY		Opioid binding protein/cell adhesion molecule like	Novel
chr1:100390671-100431735	LSRFISIVAFV		Contactin associated protein-like 5B	Novel
chr1:66195358-66251666	PWSRTKLSLSD		Microtubule-associated protein 2	Novel
chr15:103651027-103655476	SLLGSFKNN		Predicted gene, 49272	Novel
chr2:169389257-169394458	FLPLPSLSLLPF		Predicted gene 14250	Novel
chr8:14695160-14726948	KANLKVSTFV		DLG associated protein 2	Novel
Q9Z1M4	DARDLAKKF		Ribosomal protein S6 kinase beta-2	Novel
P36536	LGLDNAGKTTL		GTP-binding protein SAR1a	IEDB*
chr7:35692915-35695301	KVPLGVSQHHLA		Dpy-19-like 3	Novel
chr1:56850363-56871331	YITISYVRAFV		Special AT-rich sequence binding protein 2	Novel
chr12:29895294-29910786	PLAGPRGPPI		Myelin transcription factor 1-like	Novel
Q99P72	AAPVPPAAAPL		Reticulon-4	Novel
P61514	VGIVGKYGTRYG		60S ribosomal protein L37a	IEDB*
chr7:79021952-79053250	FGYLSHHA		Predicted gene, 26633	Novel

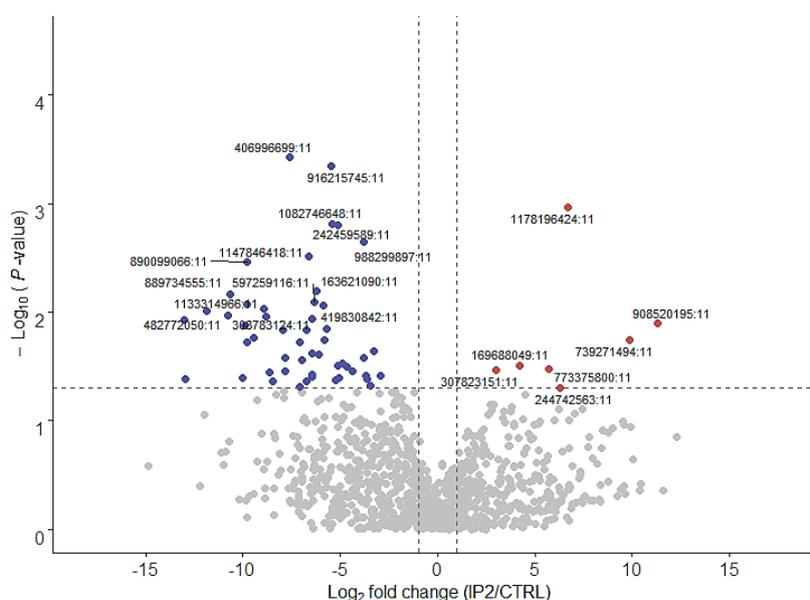
chr12:25434179-25470055	PTPALCTESI	>100	Predicted gene, 36723	Novel
chr1:46249938-46253389	TYSTGFVLY		Dynein, axonemal, heavy chain 7B	Novel
chr16:38369572-38372017	ICSLPDREFFV		Popeye domain containing 2	Novel
chr5:143077457-143080243	APLALCLLLFV		Ring finger protein 216	Novel
chr17:15507434-15513549	FGLLQRANITSP		TATA-box binding protein	Novel
chr7:114811708-114829053	LDPKIKPD	>1000	INSC spindle orientation adaptor protein	Novel
chr5:127796083-127864614	FLCISPLPLSKS		Transmembrane protein 132D	Novel

**Figure 35: Variations des peptides H-2K<sup>b</sup> observées sur la base B16F10 « Retained Introns + Uniprot ».**

(A) Diagramme de dispersion des peptides dont la présentation varie après traitement avec IP2.

(B) Liste des peptides dont la présentation varie significativement après traitement avec IP2.

(A)



(B)

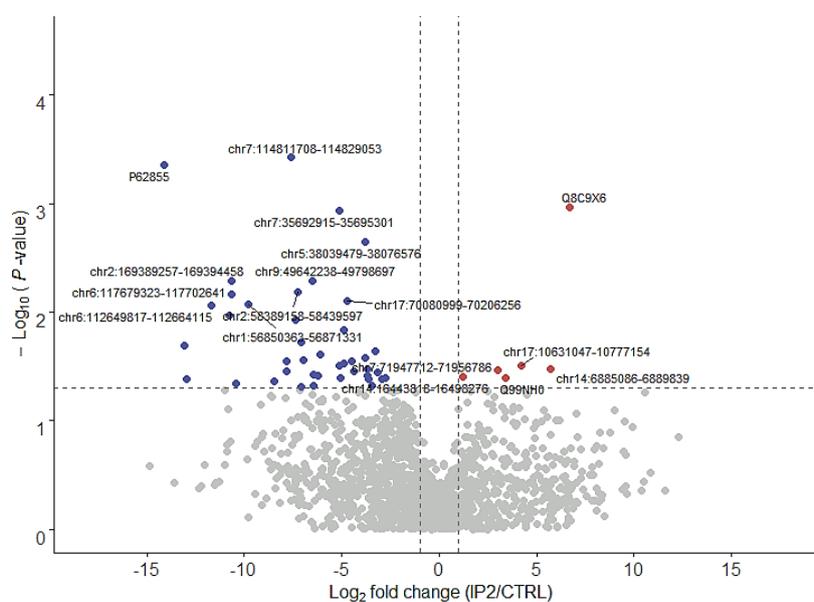
Accession number	Sequence	FC	Gene	Region	Description
307823151:11	QW <b>A</b> /SPNSPAI	>2	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type M	Exon	Novel
988299897:11	PEGAALYGLP	>10	Syntaxin 18	Intron	Novel
169688049:11	ELKTLMHVSLP		Ubiquitin Specific Peptidase 3	Intron	Novel
242459589:11	RDWKLPRSS		Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	Intron	Novel
1082746648:11	ARDLAKKF		Ribosomal protein S6 kinase beta-2	Exon	Novel
916215745:11	RVWREQRKYTI		Dipeptidylpeptidase 8	Exon	Novel
773375800:11	PSLSPPAAPGP		Glutaminase	Exon	Novel
419830842:11	PVGVLNPVN		Aspartate-beta-hydroxylase	Intron	Novel
163621090:11	IPAPGKQGRR		Jpx transcript, Xist activator	lncRNA	Novel
244742563:11	FRVFLFLRQSL		Integrin Subunit Alpha 11	Intron	Novel
597259116:11	PVRSVQSHSM		PTPRF interacting protein alpha 1	Intron	Novel
1147846418:11	VLQFVAMWLWI		NUMB endocytic adaptor protein	Exon	Novel
1178196424:11	VVGAESNLV <b>MR</b> /K		Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1	Intron	Novel
406996699:11	LDPKIKPD		>100	INSC spindle orientation adaptor protein	Intron
308783124:11	GPVCPKAAIP	Ubiquitin protein ligase E3B		Exon	Novel
1133314966:11	VHAVKWKMSVF	HAUS augmin-like complex, subunit 6		Exon	Novel
890099066:11	RPRKQASIRIY	E3 Ubiquitin-Protein Ligase HERC2		Intron	Novel
739271494:11	PIQTISYSKVS	SS18 Subunit Of BAF Chromatin Remodeling Complex		Intron	Novel
889734555:11	RPPTRPYFLVF	Clathrin interactor 1		Intron	Novel
908520195:11	RTGKFIERKNR	Coiled-Coil Domain Containing 141		Intron	Novel
482772050:11	KPHLKHSAFQ	>1000	Oxysterol binding protein-like 8	Intron	Novel

**Figure 36: Variations des peptides H-2D<sup>b</sup> observées sur la base B16F10 « All Frame ».**

(A) Diagramme de dispersion des peptides dont la présentation varie après traitement avec IP2.

(B) Liste des peptides dont la présentation varie significativement après traitement avec IP2.

(A)



(B)

Accession number	Sequence	FC	Gene	Description
chr14:16443818-16498276	VANKIGII	>2	60S ribosomal protein L23a	IEDB
chr7:71947712-71956786	VSISNSTYI		Predicted gene, 36633	Novel
Q99NH0	ASVLNVNHI	>10	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	IEDB
chr5:38039479-38076576	PEGAALYGLP		Syntaxin 18	Novel
chr17:10631047-10777154	VLNSLELELHT		PARK2 coregulated	Novel
chr17:70080999-70206256	YLHDIKKF		DLG associated protein 1	Novel
chr7:35692915-35695301	KVPLGVSQHHLA		Dpy-19-like 3	Novel
chr14:6885086-6889839	TAPAPAPATP		Predicted gene 3667	Novel
chr9:49642238-49798697	ALAPSVLPPLAA		Neural cell adhesion molecule 1	Novel
Q8C9X6	LAAAANCQVSKV		Enhancer of polycomb homolog 1	Novel
chr2:58389158-58439597	LPASGVVIVQP	>100	Activin A receptor, type 1	Novel
chr7:114811708-114829053	LDPKIKPD		INSC spindle orientation adaptor protein	Novel
chr1:56850363-56871331	YITISYVRAFV		Special AT-rich sequence binding protein 2	Novel
chr2:169389257-169394458	FLPLPSLSLLPF		Predicted gene 14250	Novel
chr6:117679323-117702641	VRNKVVICYSVI	>1000	RIKEN cDNA 1700030F04 gene	Novel
chr6:112649817-112664115	ALCGPLHGTLHP		RAD18 E3 ubiquitin protein ligase	Novel
P62855	AAPRPPPKPM		40S ribosomal protein S26	IEDB

**Figure 37: Variations des peptides H-2D<sup>b</sup> observées sur la base B16F10 « Retained Introns + Uniprot ».**

(A) Diagramme de dispersion des peptides dont la présentation varie après traitement avec IP2.

(B) Liste des peptides dont la présentation varie significativement après traitement avec IP2.

Certains peptides sont enrichis de manière significative à la surface des cellules MCA205 ou B16F10 après traitement avec IP2 alors que certains autres sont appauvris, particulièrement sur les cellules B16F10. On assiste donc à un remodelage complet de l'immunopeptidome du CMH-I et non pas uniquement à un enrichissement sélectif de certains peptides. L'utilisation des différentes bases de données nous a permis d'identifier des épitopes dérivant d'exons mais également d'introns, d'une séquence intergénique et d'introns retenus. De manière générale, les épitopes dérivant de séquences exoniques non mutées que nous avons identifiés dans cette étude sont déjà référencés dans l'IEDB ce qui valide notre méthode d'identification. Les néoantigènes spécifiques des MCA205 ou des B16F10 enrichis après traitement avec IP2 sont particulièrement dignes d'intérêt car ils sont spécifiques de la cellule cancéreuse.

### **3.2 IP2 induit des néoantigènes à la surface des cellules tumorales**

Les résultats de l'analyse protéogénomique nous ont de plus permis d'identifier des séquences qui apparaissent à la surface des MCA205 et des B16F10 uniquement après traitement avec IP2. Il s'agit donc de néoantigènes induits par le traitement. Ces derniers sont listés dans les **Tableaux 3** et **4** ci-après.

Nous avons constaté que les néoantigènes induits par le traitement avec IP2 pouvaient également dériver de séquences exoniques (« Exon »), d'introns (« Intron ») et d'introns retenus (« Ret. Intron ») mais également de séquences amplificatrices (« Enhancer ») ou promotrices (« PFR »). Nous avons identifié des néoantigènes mutés qui n'apparaissent qu'après traitement avec IP2.

**Tableau 3: Liste des néoantigènes induits par IP2 à la surface des MCA205.**

Database	Epitope sequence	Gene	Region	Alloantigen
MCA 205 "All frame"	YTTH/PH/PSEELY/SR	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	Exon	H-2Kb
	YWFVLWDFSVC	Serpinb9	Intron	H-2Kb
	SHASRTLPH/HPPF	PDZ domain-containing protein GIPC1	Intron	H-2Kb
	VDWFPVFRDL	Transmembrane protein 43	Exon	H-2Kb
	FEESAVMVLN	Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	Intron	H-2Kb
	KQSVYK/TGSLPV	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	Intron	H-2Kb
	VLEIEPRPA/SCL	n.d.	Enhancer	H-2Kb
	VSPPLPQKP	n.d.	PFR	H-2Kb
	SLNKHKTR/LISC	TATA-box binding protein-associated factor 1D	Intron	H-2Kb
	QFLDFQIV	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	Intron	H-2Db
	/SLSIYAPARLA	Cyclin-F	Exon	H-2Db
MCA205 "Ret. Introns + Uniprot"	VWDFVMLRDI	Solute carrier family 38, member 6	Ret. Intron	H-2Kb
	EESFPGFVNL	Nesprin-1	Exon	H-2Kb
	NMWRSEDSK	Family with sequence similarity 129, member A	Ret. Intron	H-2Kb
	LDIPEQAGQR	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C12	Ret. Intron	H-2Kb
	PKTALAPHPK	Lysosomal Trafficking Regulator	Ret. Intron	H-2Kb
	SQKHIDFSLR	40S ribosomal protein S9	Exon	H-2Kb
	FQFDLQIV	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	Ret. Intron	H-2Db
	SIYAPARL	Cyclin F	Exon	H-2Db
DSPPVRAVLSPS	Sec1 family domain containing 2	Ret. Intron	H-2Db	

**Tableau 4: Liste des néoantigènes induits par IP2 à la surface des B16F10.**

Database	Epitope sequence	Gene	Region	Alloantigen
B16F10 "All frame"	PPTIT/MSPSF	Histone-lysine N-methyltransferase EZH1	Intron	H-2Kb
	TIFNVLGKM	Ubiquitin specific peptidase 40	Intron	H-2Kb
	PTPHRKSFYWR	n.d.	PFR	H-2Kb
	PVRYTIKFIVF	Dedicator of cytokinesis protein 11	Intron	H-2Kb
	KLELPYAPPL	Transcription regulator protein BACH2	Intron	H-2Db
	LHPGSLPKF	Type II inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase	Intron	H-2Db
B16F10 "Ret. Introns + Uniprot"	TIFNVLGKM	Ubiquitin specific peptidase 40	Ret. Intron	H-2Kb
	PTVVTKPPFLQR	LncRNA predicted gene 48619	Ret. Intron	H-2Kb
	PPTLVGESF	Phospholipid phosphatase related 1	Ret. Intron	H-2Kb
	VEVEVRKPKRSN	Dipeptidyl peptidase like 10	Ret. Intron	H-2Kb
	KQQSARLLPC	MRN complex interacting protein	Ret. Intron	H-2Kb
	HLPSPIGKF	Calmodulin-lysine N-methyltransferase	Ret. Intron	H-2Db
	APLAVTFARRT	LRR binding FLII interacting protein 1	Ret. Intron	H-2Db
	KLELPYAPPL	BTB domain and CNC homolog 2	Ret. Intron	H-2Db

## 4. Stratégies de vaccination peptidique – Combinaisons IP2/peptide

### 4.1 Pré-sélection des peptides candidats

L'étude protéogénomique nous a permis d'identifier des antigènes enrichis à la surface cellulaire des cellules MCA205 et des B16F10 après traitement avec IP2 ainsi que des néoantigènes qui apparaissent après traitement.

Nous avons procédé à une première sélection parmi ces peptides en appliquant les critères suivants : (i) longueur 8-12 acides aminés (ii) ANOVA  $p < 0.05$  (iii) origine précise connue. Pour chacun de ces épitopes, nous avons synthétisé un peptide long (SLP) de 38 ou 39 acides aminés où l'épitope est en position centrale, encadré par les acides aminés naturellement exprimés dans la protéine d'origine. Si les séquences flanquant l'épitope contiennent un codon Stop il est remplacé arbitrairement par une Alanine (A). Nous avons préféré des SLPs à des peptides courts pour les raisons déjà développées dans l'introduction de cette thèse (voir 2.1 Les vaccins thérapeutiques). Un SLP est une prodrogue qui requiert un traitement par une pAPC avant présentation de l'épitope alors qu'un peptide court peut s'accumuler à la surface de cellules non professionnelles qui n'expriment pas de signaux de co-stimulation et ne peuvent donc pas activer efficacement les LT CD8<sup>+</sup> (Bijker et al., 2008). Néanmoins, la synthèse de ces SLPs qui ont un avantage du point de vue biologique est plus longue, plus complexe (hydrophobicité) et plus coûteuse. Pour ces raisons, la synthèse de certains des peptides n'a pas pu être menée à terme.

Finalement, nous avons établi une liste de 27 candidats sur la base MCA205 « All Frame », 10 candidats sur la base MCA205 « Retained Introns + Uniprot » et 8 candidats sur la base de données B16F10 « Retained Introns ». Dans les **tableaux 5 et 6** ci-après on peut retrouver la liste de ces peptides ainsi que l'identifiant qui leur a été attribué pour la suite de l'étude.

**Tableau 5: Liste des peptides candidats MCA205.**

Database	ID	SLP sequence (Epitope)	Région	FC
MCA205 "All frame"	MCA205 KB-1	GQIIFLPFTCIGYTD <b>TNQDFIQLR</b> STLIRQAIERQLPAW	exon	>100
	MCA205 KB-2	PSKARYSALSMI <b>FEESAVMVLN</b> MNTQAHWLSKWGAAT	intron	∞
	MCA205 KB-3	LMIKSKEGGGLGAM <b>GRIWEELEEVD</b> HNQDILYEEDYLSI	intron	>100
	MCA205 KB-5	THHMQWYAVWFGGS <b>LASTPEFYQV</b> CHTKKDYEEIGPSI	exon	>100
	MCA205 KB-6	RQDSAVTWLLCAFP <b>KQSVYKGS</b> LPVQSSRRVSNVALPQ	intron	∞
	MCA205 KB-7	SELYIRTRRYSIL <b>LLFLLHRHTV</b> QPKVSETNAAVFPR	intron	>100
	MCA205 KB-9	PTMMYQWAQSCLLHHFN <b>QILMLKTL</b> ATLNHGHEIQLQVHA	intron	>1000
	MCA205 KB-10	PPRLTDAFAAGAVPL <b>SHASRTLPP</b> FPGPAPRQFLRLAQ	intron	∞
	MCA205 KB-11	VSSRTARTQRNAV <b>SLNKHKTRIS</b> CRAVVAHAFNPS	intron	∞
	MCA205 KB-12	LVFSQRGPEEDPLNS <b>VSPPLPQK</b> PNSPIKCKKWSTASQ	PFR	∞
	MCA205 KB-13	QPLATGPMAIPEG <b>SYWYWTYKEW</b> EKTGPTHLEEKLKKK	exon	>10
	MCA205 KB-15	YLSHIGAIYCAL <b>TTQRDPSML</b> AAPTWSAKQAKTRPKP	enhancer	>1000
	MCA205 KB-16	ETSFHYHTWLYMW <b>VLEIEPR</b> ACLCEHITDAVSYP	enhancer	∞
	MCA205 KB-17	DNAVQGLRHHEILQ <b>WVLQTD</b> SQQGAHPQHPLPPSLGAWI	exon	>10
	MCA205 KB-18	DELDPRESEKVKIT <b>KVDF</b> FAGEEVRAEGPRGWKRVL	exon	>10
	MCA205 KB-19	LPAGVFCILAVIQD <b>YTHHSEEL</b> YRDLVNLKPYIRAAQ	exon	∞
	MCA205 DB-1	HSTLKVLSGLLGWV <b>CFCEVQTY</b> FSTYRTCHIKCLL	intron	>100
	MCA205 DB-2	WQQDEPQSQWDKVK <b>DLATVYVD</b> VLKDSGRDYVSQFESS	exon	>2
	MCA205 DB-5	GLHPMWPSTSGTF <b>FLIMKPLHR</b> QILGAGHTLDFPLPKL	intron	>100
	MCA205 DB-7	KGQGHSTGAGDRI <b>GLRDPFL</b> TASCGLSLRKKGRRFAL	intron	>10
	MCA205 DB-8	PPLPKLIRLTQLK <b>HRLVEKEF</b> RIRLAAICTLNKFLAG	intron	>10
	MCA205 DB-9	HLCSFLCELTLLHT <b>ILSIYAPAR</b> LASAALLLARLMHGQS	exon	∞
	MCA205 DB-10	KEATPLNSSQMVPL <b>TGK</b> HANICVCGSHLSAHCIRPP	intron	>10
	MCA205 DB-11	PLSKSPCPARFSS <b>SALARVASE</b> PASSAISLSPVAAGQ	exon	>2
	MCA205 DB-12	ITTPKDTFSSPALP <b>PEKARPLL</b> TQEEPQAGTHQACSSPT	intron	>2
MCA205 DB-14	CSDRPTVIYSSNHK <b>VVFSNVNL</b> KEVNYMCPLNSDGYPDR	exon	>10	
MCA205 DB-15	PAGSFPPVLPVPR <b>VVKLV</b> IPPWVFTFLISLCRNSHCCD	intron	>2	
MCA205 "Ret. Intron + Uniprot"	MCA205 KB-20	GPTPSAKPSAFPL <b>VWDFVMLR</b> DLAHARNSRTRGQVA	ret. intron	∞
	MCA205 KB-21	SIDSVRRLEHKLA <b>EESEFP</b> GFVNLSSTETQTAGVIDRW	exon	∞
	MCA205 KB-22	GQIIFLPFTCIGYTA <b>TNQDFIQLR</b> STLIRQAIERQLPAW	exon	>100
	MCA205 KB-23	HMQRYAVWFGGS <b>MLASTPEFYQV</b> CHTKKDYEEIGPSIC	exon	>100
	MCA205 KB-24	GSMYYNGIGVKRDY <b>KQALKYFN</b> LASQGGHILAFYNLAQ	exon	>10
	MCA205 KB-25	EHFNTCFAKHSLPR <b>LDIPEQAGQR</b> STTQASKKFTHGDS	ret. intron	∞
	MCA205 KB-26	FAKVTDLPVAIPLR <b>PKTALAPHP</b> KTAADAVKDALLEPC	ret. intron	∞
	MCA205 KB-27	KQVVNIPSFIVRLD <b>SQKHIDF</b> SLRSPYGGGRPGRVCRK	exon	∞
	MCA205 DB-16	LCSFLCELTLLHTSL <b>SIYAPAR</b> LASAALLLARLMHGQT	exon	∞
	MCA205 DB-17	ASLGESTTVANCND <b>SPPVRAV</b> LSPSAKHPHVVCALLSI	ret. intron	∞

FC: Fold Change; PFR: Promoter Flanking Region; ret. intron: retained intron; ∞: neoantigen

**Tableau 6: Liste des peptides candidats B16F10.**

Database	ID	SLP sequence ( <b>Epitope</b> )	Région	FC
B16F10 "Ret. Intron + Uniprot"	B16F10 KB-2	QVQPSRQMWQTKIHS <b>PPTLVGESF</b> QWSPAKQSFSGSQAHA	ret. intron	∞
	B16F10 KB-3	TVQVAASVSETK <b>VEVEVRKPKRSN</b> SGLCVHICKIMLD	ret. intron	∞
	B16F10 KB-4	MTEVRHCAFLAGSC <b>KQQSARLLPC</b> YTVGHKKTRGAAGC	ret. intron	∞
	B16F10 KB-5	YRAYGSQKAMLSVSS <b>TYSTGFVLY</b> YKSYSVFLYIYNLNI	ret. intron	>100
	B16F10 KB-6	IVIKTMGPTSLPSL <b>PTPALCTES</b> ILAPGGGAGWGGLEP	ret. intron	>100
	B16F10 DB-1	LSELLRAWLFDWPAL <b>HLPSPIGKF</b> CLRWLLDPSQNSQMG	ret. intron	∞
	B16F10 DB-2	GRASSYSGLAHRDP <b>APLAVTFARTE</b> EGLQQLLVFDLNC	ret. intron	∞
	B16F10 DB-3	AEIVPLKLRTRKA <b>KLELPYAPPL</b> EEMAI SARQRATCL	ret. intron	∞

*FC: Fold Change; ret. intron: retained intron; ∞: neoantigen*

On notera que les SLPs MCA205 KB-1 et MCA205 KB-22, d'une part, et MCA205 DB-9 et MCA205 DB-16, d'autre part, contiennent le même épitope. Cependant, les SLPs diffèrent au niveau des séquences flanquant l'épitope car ils n'ont pas été construits à partir des mêmes bases de données.

Notre intérêt se porte maintenant sur l'immunogénicité de ces peptides. Avant de procéder à l'évaluation *in vivo* de l'activité antitumorale nous avons procédé à une pré-sélection des peptides induisant une population de LT CD8<sup>+</sup> réactive par un test ELISpot IFN $\gamma$ . Pour ce faire, et afin d'optimiser la sélection, nous avons regroupé de manière aléatoire les peptides en groupes d'immunisation de trois peptides (**Tableau 7**). L'immunogénicité de chaque groupe de peptides a été évaluée au moins deux fois de manière indépendante par ELISpot IFN $\gamma$ .

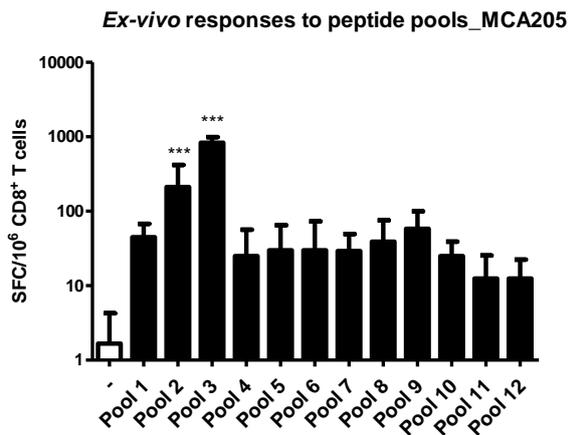
**Tableau 7: Composition des groupes d'immunisation.**

<b>G1</b>	MCA205 KB-2 MCA205 KB-6 MCA205 KB-11	<b>G6</b>	MCA205 DB-1 MCA205 DB-5 MCA205 DB-9	<b>G11</b>	MCA205 KB-23 MCA205 KB-24 MCA205 KB-25
<b>G2</b>	MCA205 KB-12 MCA205 KB-15 MCA205 KB-16	<b>G7</b>	MCA205 DB-7 MCA205 DB-8 MCA205 DB-10	<b>G12</b>	MCA205 KB-26 MCA205 KB-27 MCA205 DB-16
<b>G3</b>	MCA205 KB-9 MCA205 KB-10 MCA205 KB-19	<b>G8</b>	MCA205 DB-2 MCA205 DB-11 MCA205 DB-12	<b>G13</b>	MCA205 DB-17 B16F10 KB-2 B16F10 KB-3
<b>G4</b>	MCA205 KB-13 MCA205 KB-17 MCA205 KB-18	<b>G9</b>	MCA205 DB-14 MCA205 DB-15 MCA205 KB-1	<b>G14</b>	B16F10 KB-4 B16F10 KB-5 B16F10 KB-6
<b>G5</b>	MCA205 KB-3 MCA205 KB-5 MCA205 KB-7	<b>G10</b>	MCA205 KB-20 MCA205 KB-21 MCA205 KB-22	<b>G15</b>	B16F10 DB-1 B16F10 DB-2 B16F10 DB-3

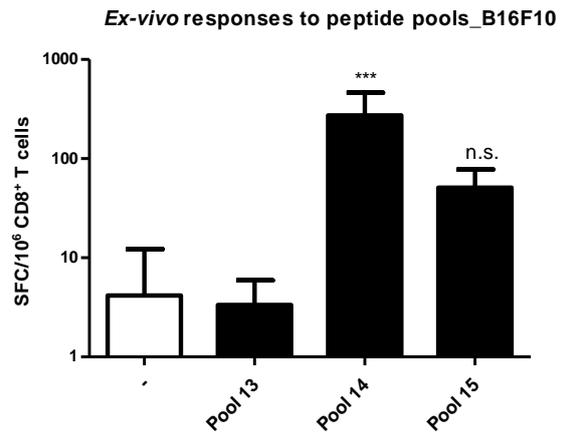
Des souris C57BL/6 ont été immunisées avec les différents groupes de peptides (100 µg de peptide au TOTAL/souris) injectés en sous-cutané (s.c.) à la base de la queue. Sept jours après immunisation, les LT CD8<sup>+</sup> de la rate de chaque souris sont isolés et mis en contact avec des BMDCs préalablement stimulées avec les peptides du groupe d'immunisation correspondant. Les LT CD8<sup>+</sup> qui reconnaissent les épitopes présentés à la surface des BMDCs sont activés et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN $\gamma$ . L'ajout d'une série d'anticorps spécifiques conduit à la formation d'un immunocomplexe dont la précipitation génère des tâches noires ou « spots ». Chaque « spot » correspond à une cellule sécrétrice d'IFN $\gamma$ , on peut ainsi estimer la fréquence des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des épitopes ciblés exprimée en nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> formant un « spot » (SFC) par million de cellules T CD8<sup>+</sup>.

Ce test ELISpot nous a permis d'identifier des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un ou plusieurs peptides contenus dans les groupes G2 et G3 chez les MCA205 (**Figure 38A**) et le groupe G14 chez les B16F10 (**Figure 38B**). Nous avons également décidé d'inclure les groupes G9 chez les MCA205 et G15 chez les B16F10 qui se démarquaient même si les résultats combinés des réplicats n'étaient pas significatifs. Enfin, nous avons inclus le groupe G10 qui contient le SLP MCA205 KB-22 dont l'épitope est commun avec le SLP MCA205 KB-1 du groupe G9.

(A)



(B)



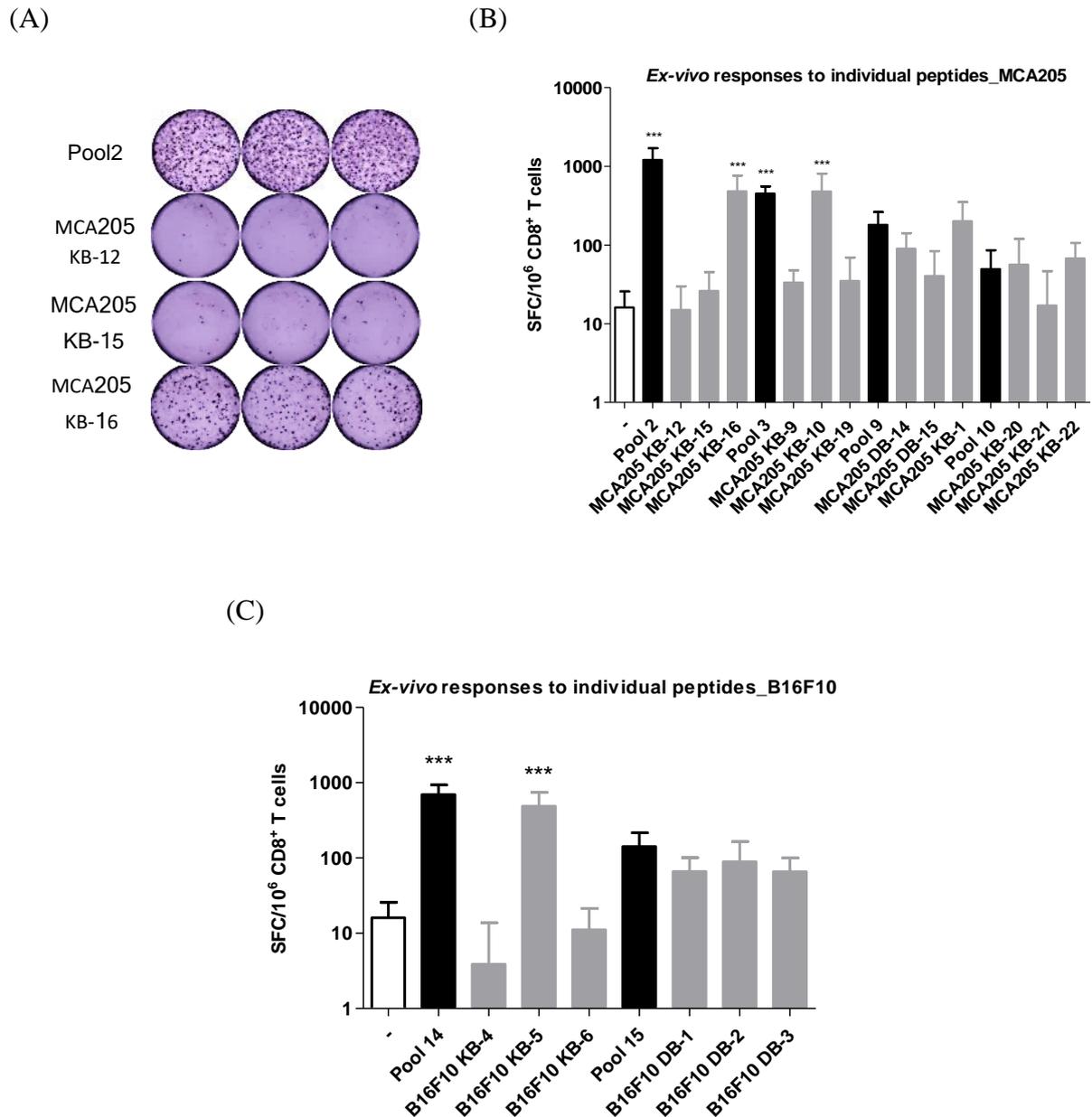
**Figure 38: Sélection des groupes d'immunisation prometteurs par ELISPOT IFN $\gamma$ .**

(A) Fréquence des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un épitope contenu dans les groupes d'immunisation MCA205.

(B) Fréquence des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un épitope contenu dans les groupes d'immunisation B16F10.

Nous avons donc procédé à la déconvolution de ces six groupes pour déterminer contre quel(s) peptide(s) était(en)t dirigée la réponse T CD8<sup>+</sup> mesurée par ELISpot IFN $\gamma$ . Nous avons à nouveau immunisé des souris mais cette fois-ci avec les peptides pris en groupe ou individuellement (100  $\mu$ g de peptide au TOTAL/souris). Nous avons une nouvelle fois estimé la fréquence de LT CD8<sup>+</sup> réactifs contre les épitopes contenus dans les différents groupes par un test ELISpot IFN $\gamma$ .

Les résultats obtenus à ce stade nous permettent de sélectionner des peptides candidats prometteurs dans chaque groupe. L'immunisation avec les SLPs MCA205 KB-16 et MCA205 KB-10 (**Figure 39A et 39B**) ainsi qu'avec le SLP B16F10 KB-5 (**Figure 39C**) génère *in vivo* une population de LT CD8<sup>+</sup> réactifs qui secrètent de l'IFN $\gamma$  quand ils reconnaissent *ex vivo* l'épitope présenté par une pAPC. La déconvolution des groupes G9 et G10 pour les MCA205 et G15 pour les B16F10 est moins évidente.



**Figure 39: Déconvolution des groupes d'immunisation par ELISPOT IFN<sub>γ</sub>.**

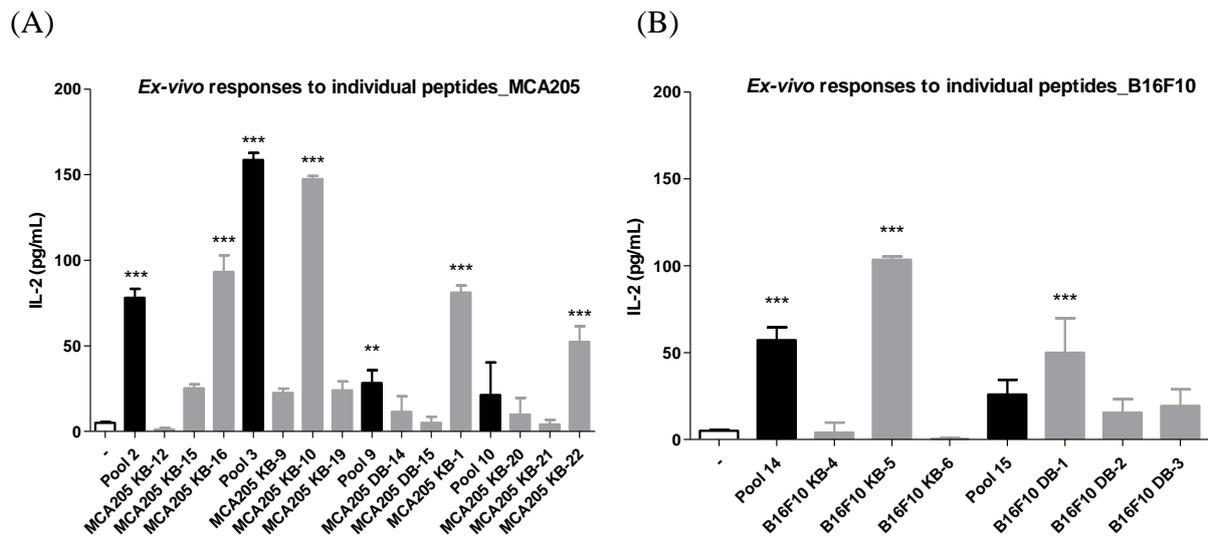
(A) Exemple de spots observés pour la déconvolution du groupe G3.

(B) Quantification du nombre de spot observés pour chaque peptide des groupes d'immunisation MCA205.

(C) Quantification du nombre de spot observés pour chaque peptide des groupes d'immunisation B16F10.

Cependant, l'IFN<sub>γ</sub> n'est pas la seule cytokine pro-inflammatoire sécrétée par un LT CD8<sup>+</sup> activé, c'est pourquoi nous avons décidé de confirmer ou affiner cette sélection par un test ELISA pour l'IL-2. Dans le test ELISpot, la cytokine étudiée est immobilisée sur une

membrane, on peut donc doser une autre cytokine d'intérêt dans le surnageant de la co-culture. On réalise donc un ELISA pour l'IL-2 en parallèle de l'ELISPOT pour l'IFN $\gamma$ . Ce test nous permet de confirmer l'immunogénicité des peptides MCA205 KB-16 et MCA205 KB-10 (**Figure 40A**) et du peptide B16F10 KB-5 (**Figure 40B**). Ce test nous permet également de sélectionner le SLP MCA205 KB-1 dans le groupe G9 et le SLP MCA205 KB-22 dans le groupe G10 (**Figure 40A**). On rappellera une fois de plus ici que ces deux SLPs sont identiques à l'exception de l'acide aminé précédent l'épitope. Dans le groupe G15, le SLP B16F10 DB-1 apparait comme le plus immunogène (**Figure 40B**). Néanmoins, compte tenu de la faible différence observée entre chacun des peptides du groupe par ce test ELISA IL-2 comme par le test ELISPOT IFN $\gamma$  nous décidons de conserver les trois SLPs pour le reste de l'étude.



**Figure 40: Déconvolution des groupes d'immunisation par ELISA IL-2.**

(A) Concentration en pg/mL d'IL-2 dans les surnageants de co-culture pour les peptides MCA205.

(B) Concentration en pg/mL d'IL-2 dans les surnageants de co-culture pour les peptides B16F10.

De manière générale on souligne la bonne corrélation des résultats des tests ELISPOT IFN $\gamma$  et ELISA IL-2 pour évaluer l'immunogénicité d'un peptide. On note cependant que la détection croisée de deux cytokines différentes nous a permis de trancher pour des cas où l'interprétation des résultats est moins évidente.

À la suite de cette pré-sélection, nous pouvons dresser une liste réduite de trois peptides

candidats pour les MCA205 et quatre peptides candidats pour les B16F10 qui seront testés *in vivo* dans le cadre de stratégies de vaccination (**Tableau 8**). Comme précédemment, les acides aminés en gras correspondent à une mutation par rapport au protéome murin de référence. Les SLPs MCA205 KB-10 et MCA205 KB-16 portent une mutation dans l'épitope tandis que le SLP MCA205 KB-1 porte une mutation sur l'acide aminé précédent l'épitope.

**Tableau 8: Liste réduite des peptides candidats MCA205 et B16F10.**

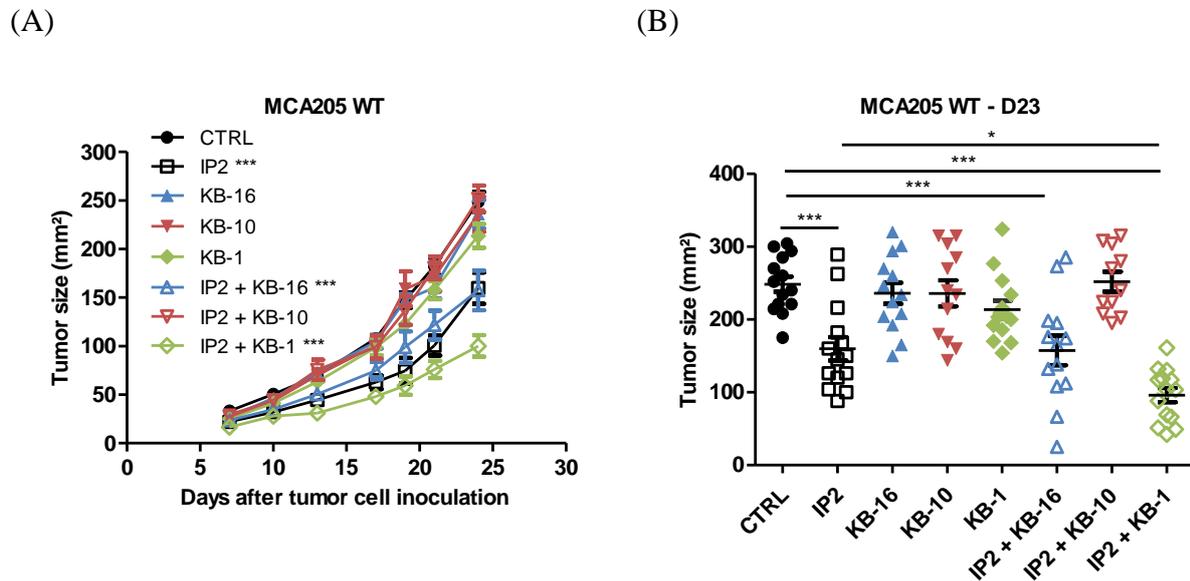
ID	SLP sequence (Epitope)	Source protein	Region	Fold change
MCA205 KB-1	GQIIFLPFTCIGYT <b>D</b> /ATNQDFIQRLSTLIR QAIERQLPAW	Nischarin	exon	>100
MCA205 KB-10	PPRLTDAFAAGAVPL <b>SHASRTL</b> P/HPPFP GPRAPQFLRLAQ	GIPC PDZ Domain Containing Family Member 1	intron	∞
MCA205 KB-16	ETSFHYHTWLYMW <b>VLEIEPRP</b> A/SCLC GEHITDAVSYP	n.d.	enhancer	∞
B16F10 KB-5	YRAYGSQKAMLSVSS <b>TYSTGFV</b> LYKYS YSVFLYIYNLNI	Dynein Axonemal, Heavy Chain 7	ret. intron	>100
B16F10 DB-1	LSLLRAWLFDWPAL <b>HLPSPIGK</b> FCLRWL LDPSQNSQMG	Calmodulin-lysine N-methyltransferase	ret. intron	∞
B16F10 DB-2	GRASSYSGLAHRDP <b>APLAVTFAR</b> TEE GLEQLLVFDLNC	LRR binding FLII interacting protein 1	ret. intron	∞
B16F10 DB-3	AEIVPLKRLRTRKA <b>KLELPYAP</b> PLEEMAS ARQRATCL	BTB domain and CNC homolog 2	ret. intron	∞

## 4.2 Vaccination prophylactique

Les SLPs MCA205 KB-1, MCA205 KB-10 et MCA205 KB-16 ont été testés *in vivo* dans le cadre d'une stratégie de vaccination prophylactique. Des souris C57Bl/6 ont été immunisées à deux reprises à deux semaines d'intervalle avec 100 µg de peptide injecté en s.c. à la base de la queue. Une semaine après la seconde immunisation, les cellules MCA205 WT ont été inoculées en s.c. dans le flanc droit. Les souris ont alors été traitées avec IP2 à 24 mg/kg à raison de deux injections par semaine sans attendre l'établissement de la tumeur.

Nous avons observé que les SLPs seuls n'ont pas une activité antitumorale ce qui était attendu car les épitopes KB-10 et KB-16 sont des néoantigènes qui ne sont pas exprimés par les cellules non traitées (voir 3.2 IP2 induit des néoantigènes à la surface des cellules tumorales) et l'épitope KB-1 l'est faiblement (**Figure 41**). Le composé IP2 seul et les combinaisons d'IP2 avec les SLPs KB-1 et KB-16 inhibent significativement la croissance tumorale des MCA205 WT. En revanche, de façon surprenante, la combinaison d'IP2 et du SLP KB-10 ne montre aucune activité antitumorale, le bénéfice thérapeutique du traitement avec IP2 étant

même perdu. Finalement, nous observons de manière significative un effet thérapeutique additif de la vaccination avec le SLP KB-1 sur le traitement avec le composé IP2.



**Figure 41: Effet prophylactique de la combinaison IP2/peptide sur la croissance des MCA205.**

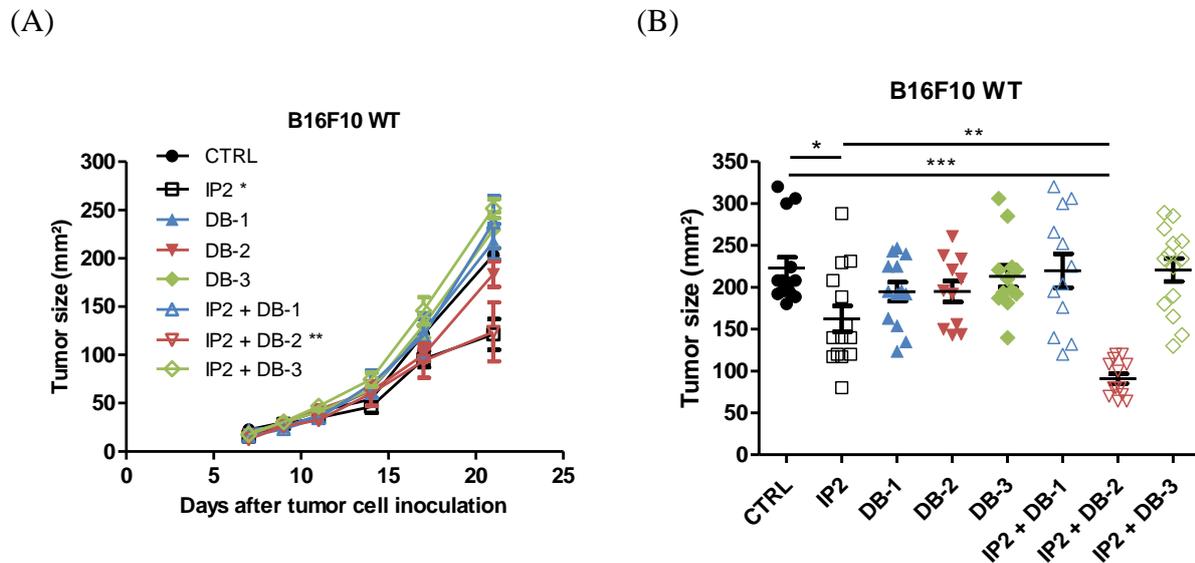
(A) Courbes de croissance tumorale des MCA205WT.

(B) Taille des tumeurs MCA205 exprimée en aire (mm<sup>2</sup>) le jour du sacrifice.

Nous avons procédé à une expérience similaire sur le modèle de mélanome B16F10 afin d'évaluer l'activité antitumorale d'un vaccin composé des SLPs B16F10 DB-1, DB-2 ou DB-3 en combinaison avec IP2. Des souris C57Bl/6 ont été immunisées à deux reprises à deux semaines d'intervalle avec 100 µg de peptide injecté en s.c. à la base de la queue. Une semaine après la seconde immunisation, les cellules B16F10 WT ont été inoculées en s.c. dans le flanc droit. Les souris ont alors été traitées avec IP2 à 36 mg/kg à raison de deux injections par semaine sans attendre l'établissement de la tumeur.

Comme pour les MCA205 WT, nous observons ici que la vaccination seule avec les SLPs n'a aucune activité antitumorale car les épitopes B16F10 DB-1, DB-2 et DB-3 sont des néoantigènes qui ne sont exprimés à la surface des B16F10 qu'après traitement avec IP2 (voir 3.2 IP2 induit des néoantigènes à la surface des cellules tumorales) (**Figure 42**). Le composé IP2 seul et la combinaison d'IP2 avec le SLP DB-2 inhibent la croissance tumorale des B16F10. En revanche, l'activité antitumorale d'IP2 est complètement perdue quand le composé est associé aux SLPs DB-1 et DB-3. De manière intéressante, nous observons de

manière significative une synergie entre le composé IP2 et la vaccination avec le SLP DB-2.



**Figure 42: Effet prophylactique de la combinaison IP2/peptide sur la croissance des B16F10.**

(A) Courbes de croissance tumorale des B16F10WT.

(B) Taille des tumeurs B16F10 exprimée en aire (mm<sup>2</sup>) le jour du sacrifice.

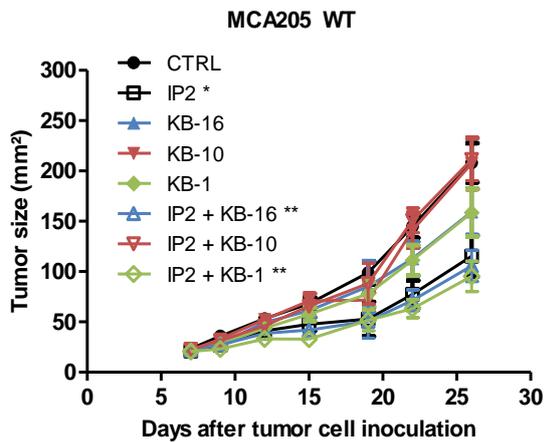
### 4.3 Vaccination thérapeutique

En parallèle de l'évaluation de l'efficacité de la vaccination prophylactique en combinaison avec le composé IP2, les SLPs MCA205 KB-1, KB-10 et KB-16 ont également été testés *in vivo* dans le cadre d'une stratégie de vaccination thérapeutique sur les MCA205 WT. Les cellules MCA205 WT ont été inoculées à des souris C57BL/6 en s.c. sur le flanc droit et les traitements ont commencé une fois les tumeurs établies (environ 25 mm<sup>2</sup>). Les souris ont alors été vaccinées une première fois avec 100 µg de peptide en s.c. à la base de la queue puis une seconde fois à une semaine d'intervalle. En parallèle, les souris ont été traitées deux fois par semaine pendant deux semaines avec IP2 à 24 mg/kg en i.p. pour induire l'expression de l'épitope ciblé à la surface cellulaire.

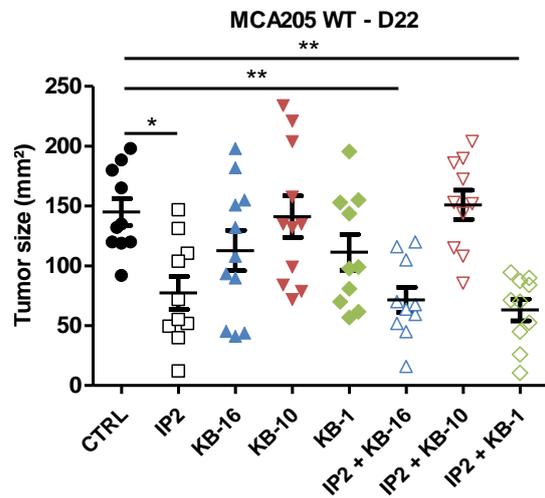
Nous avons une nouvelle fois observé que les peptides seuls n'ont pas une activité antitumorale (**Figure 43A et 43B**). En revanche, le composé IP2 seul et les combinaisons d'IP2 avec les SLPs KB-16 et KB-1 inhibent la croissance tumorale de manière significative mais nous n'observons pas d'effet thérapeutique additif de la vaccination peptidique avec les

SLPs KB-1 et KB-16 sur le traitement avec le composé IP2 seul. Comme dans le cadre de la vaccination prophylactique, la combinaison d'IP2 et du SLP KB-10 est délétère car l'activité thérapeutique du composé IP2 est perdue.

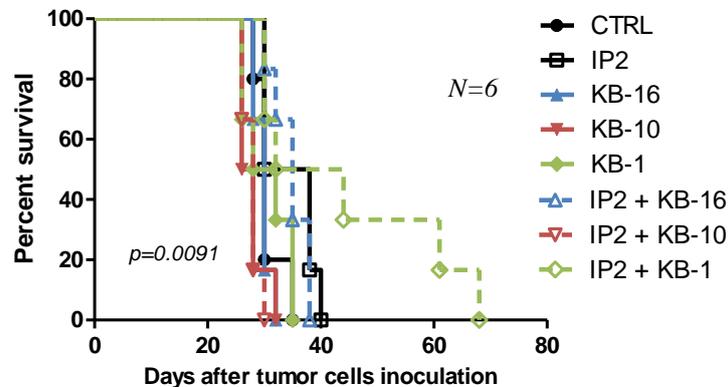
(A)



(B)



(C)



**Figure 43: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/peptide sur la croissance des MCA205.**

(A) Courbes de croissance tumorale des B16F10WT.

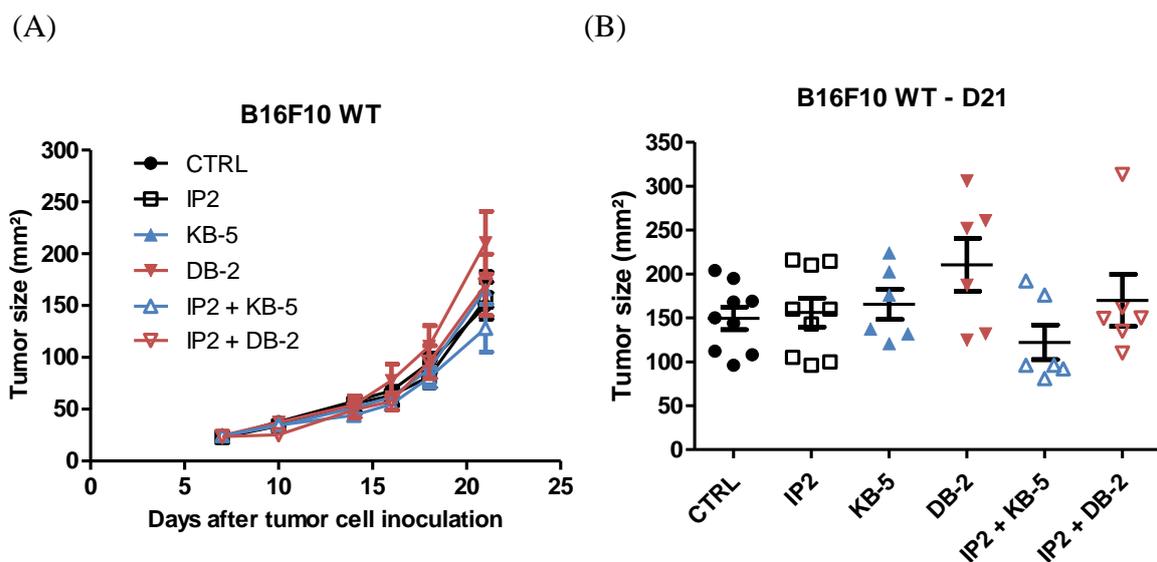
(B) Taille des tumeurs MCA205 exprimées en aire (mm<sup>2</sup>) à J22

(C) Courbe d'estimation de Kaplan Meier de la survie globale après traitements.

De manière intéressante, si l'on ne peut pas observer d'effet additif de la vaccination peptidique sur le composé IP2 à J22, les souris qui ont reçu la combinaison du composé IP2 et du SLP KB-1 survivent plus longtemps (**Figure 43C**). La combinaison entre IP2 et la vaccination peptidique permet une augmentation de la survie globale qui n'est pas observée

avec le composé IP2 seul. Ce résultat n'est pas non plus observé avec la combinaison d'IP2 et du SLP KB-16.

Nous avons également procédé à l'évaluation *in vivo* de l'activité antitumorale des SLPs B16F10 KB-5 et DB-2 en combinaison avec le composé IP2 sur les B16F10 WT. De la même façon, les souris ont été vaccinées avec 100 µg de peptide en s.c. à la base de la queue une première fois à J7 puis une seconde fois à J14. En parallèle, les souris ont été traitées deux fois par semaine pendant deux semaines avec IP2 à 36 mg/kg en i.p.. Nous avons observé que ni les traitements seuls ni les combinaisons de traitement ne permettent de contenir la croissance des B16F10 (**Figure 44**). Néanmoins, l'inefficacité du traitement avec IP2, dans cet exemple, ne nous permet pas de tirer de conclusions et nous invite à répéter cette expérience.



**Figure 44: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/peptide sur la croissance des B16F10.**

(A) Courbes de croissance tumorale des B16F10WT.

(B) Taille des tumeurs MCA205 exprimées en aire (mm<sup>2</sup>) à J21.

Ces expériences de vaccinations prophylactiques et thérapeutiques montrent l'intérêt de la combinaison d'un vaccin peptidique pour stimuler les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un TAA ou d'un TSA et du composé IP2 pour induire l'expression de cet antigène à la surface de la cellule tumorale. Par ailleurs, il apparaît primordial de bien choisir l'antigène ciblé par le

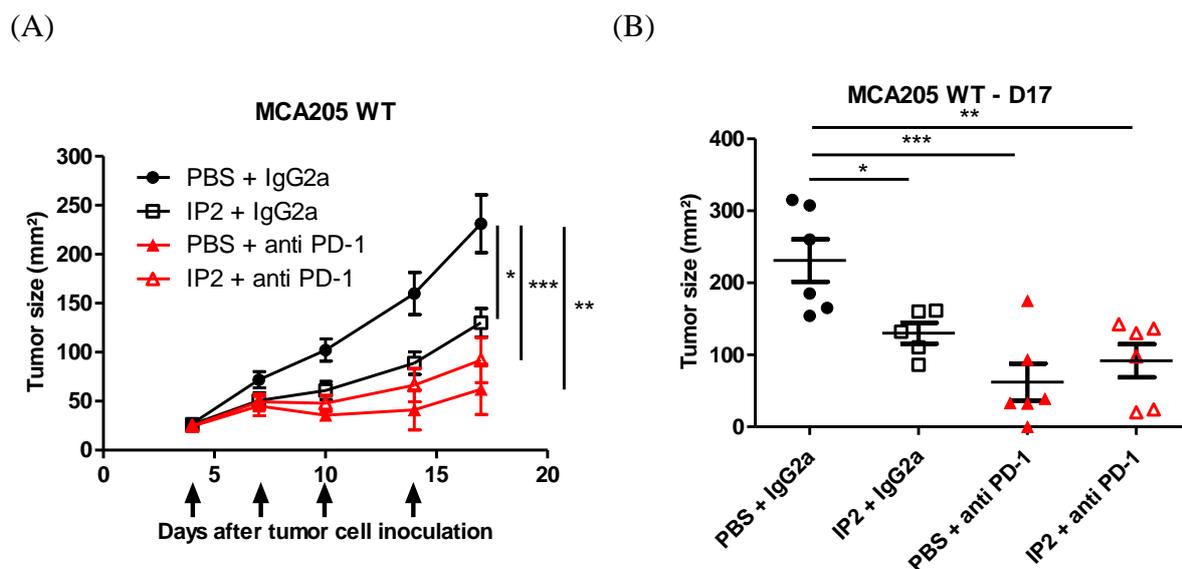
vaccin peptidique pour que ce dernier ne neutralise pas l'effet du composé immunomodulateur.

#### 4.4 Combinaison de la vaccination peptidique et de l'anti-PD-1 en thérapeutique

Le composé IP2 stimule la présentation de peptides antigéniques immunogènes par les cellules tumorales et conduit à la prolifération de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de ces antigènes. Cependant, l'activation des cellules T s'accompagne de l'expression du récepteur inhibiteur PD-1 qui compromet l'activité antitumorale (Agata et al., 1996). La combinaison des immunothérapies, en particulier des vaccins peptidiques, avec l'anti-PD-1 a montré un bénéfice clinique réel (voir

3.2 Lever les freins de la réponse immunitaire).

Nous avons donc évalué l'apport d'un traitement avec un anti-PD-1 à notre traitement avec le composé IP2. Des cellules MCA205 WT ont été inoculées en s.c. à des souris C57Bl/6 immunocompétentes. Une fois les tumeurs établies (25 mm<sup>2</sup>), les souris ont été traitées de manière concomitante avec IP2 à 24 mg/kg et l'anti-PD-1 à 10 mg/kg. Nous avons observé que le traitement avec IP2 ou l'anti-PD-1 inhibe la croissance tumorale des MCA205 WT mais que la combinaison des deux traitements ne montre pas d'intérêt thérapeutique en comparaison avec les monothérapies (**Figure 45**).



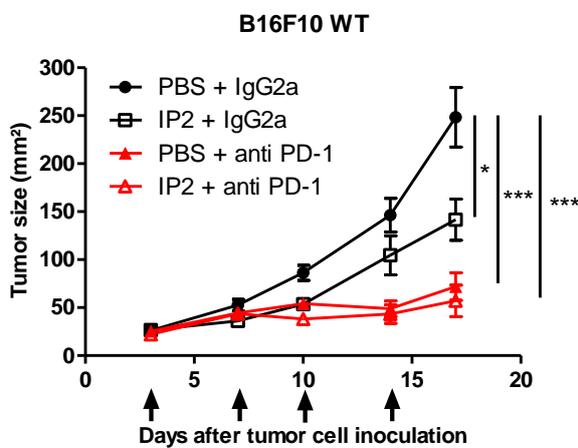
**Figure 45: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/anti-PD-1 sur la croissance des MCA205 WT.**

(A) Courbes de croissance tumorale des MCA205WT.

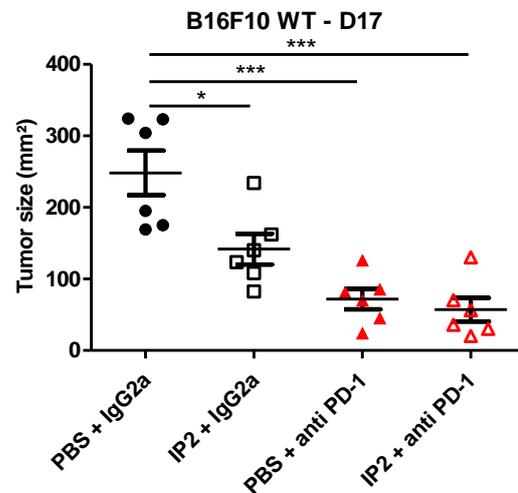
(B) Taille des tumeurs MCA205 exprimée en aire (mm<sup>2</sup>) le jour du sacrifice.

Nous avons également testé la combinaison d'IP2 et de l'anti-PD-1 sur le modèle B16F10 WT. Comme précédemment, les cellules B16F10 WT ont été inoculées en s.c. à des souris immunocompétentes et les traitements ont commencé quand la taille des tumeurs a atteint 25 mm<sup>2</sup>. Les souris ont alors été traitées de manière concomitante avec IP2 à 36 mg/kg et l'anti-PD-1 à 10 mg/kg. Le composé IP2 seul ainsi que l'anti-PD-1 seul inhibe la croissance tumorale des B16F10 WT, en revanche, comme pour les MCA205 la combinaison d'IP2 avec l'anti-PD-1 ne montre pas d'intérêt thérapeutique par rapport aux monothérapies (**Figure 46**).

(A)



(B)

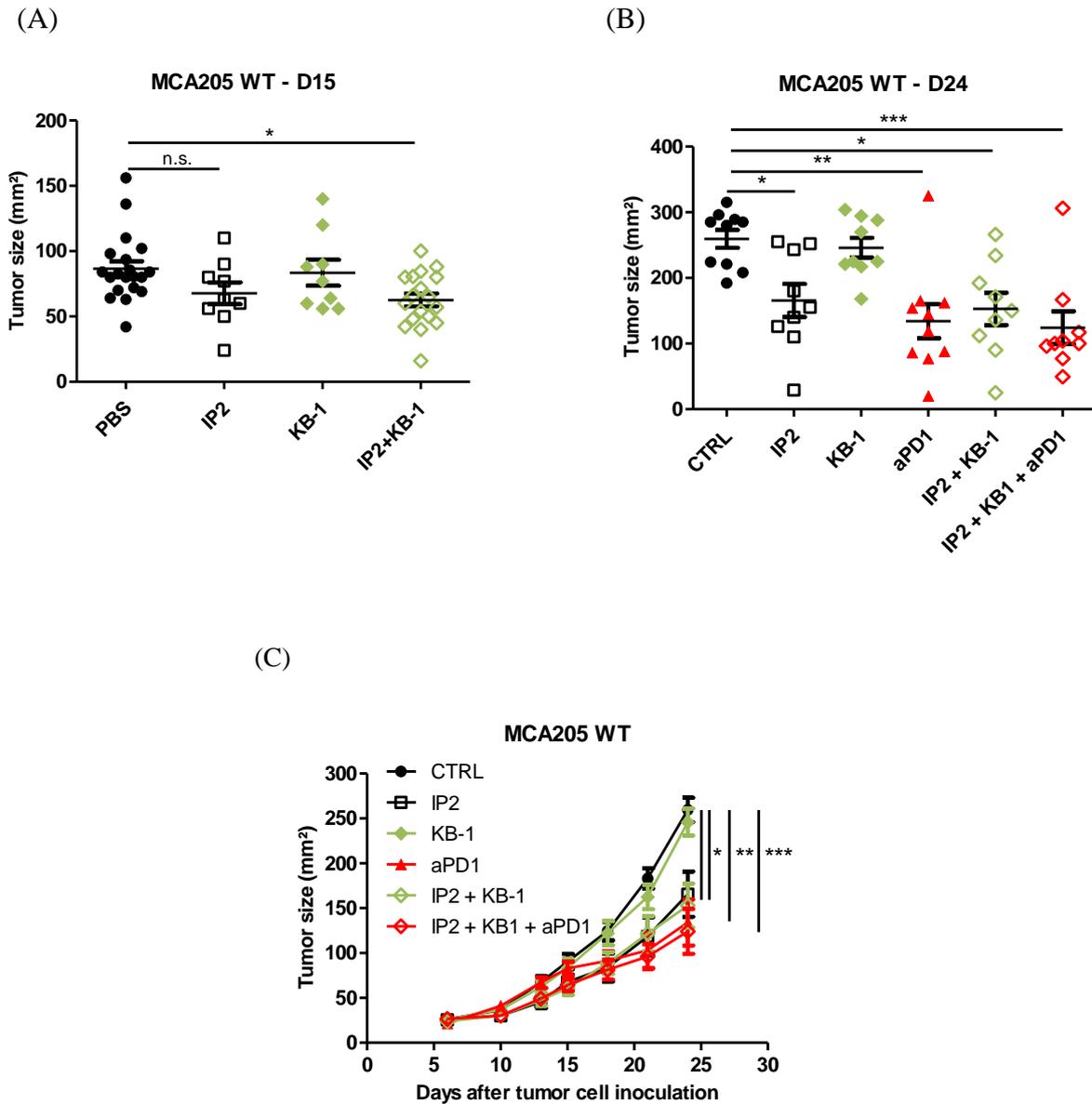


**Figure 46: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/anti-PD-1 sur la croissance des B16F10 WT.**

(A) Courbes de croissance tumorale des B16F10 WT.

(B) Taille des tumeurs B16F10 exprimée en aire (mm<sup>2</sup>) le jour du sacrifice.

Dans un second temps, nous avons testé l'efficacité de la combinaison de l'anti-PD-1 et de la vaccination peptidique. Nous avons sélectionné le SLP MCA205 KB-1 qui, uniquement en combinaison avec IP2, inhibe la croissance tumorale des MCA205 WT et augmente la survie globale. Les cellules MCA205 WT ont été inoculées en s.c. à des souris C57Bl/6 immunocompétentes. Une fois les tumeurs établies (25 mm<sup>2</sup>), les souris ont été vaccinées avec le SLP MCA205 KB-1 en s.c. à la base de la queue et traitées en parallèle avec IP2 à 24 mg/kg en i.p.. Une semaine après vaccination, nous observons un effet antitumoral de la combinaison IP2/peptide qui n'est pas observé de manière significative avec le composé IP2 seul (**Figure 47A**). L'anti-PD-1 est alors administré en i.p. à 10 mg/kg tous les trois jours. En parallèle, les souris sont vaccinées une seconde fois avec le SLP MCA205 KB-1 et traitées avec IP2 à 24 mg/kg. Nous avons observé un ralentissement de la croissance tumorale des MCA205 dès la première injection avec l'anti-PD-1 (**Figure 47B**). En définitive, nous n'observons pas de différence d'activité thérapeutique entre IP2 seul, l'anti-PD-1, la combinaison IP2/KB-1 ou la triple combinaison IP2/KB-1/anti-PD-1 (**Figure 47C**). Il convient de rappeler ici que le traitement avec l'anti-PD-1 est initié une semaine après le début du traitement avec IP2 ou le vaccin peptidique, sur des tumeurs de 85 mm<sup>2</sup> en moyenne.



**Figure 47: Effet thérapeutique de la combinaison IP2/peptide/anti-PD-1 sur les MCA205.**

(A) Taille des tumeurs MCA205 avant le début du traitement avec l'anti-PD-1.

(B) Courbes de croissance tumorale des MCA205.

(C) Taille des tumeurs MCA205 le jour du sacrifice.

Ces différentes études nous permettent de conclure que la combinaison d'IP2 et/ou de la vaccination peptidique avec l'anti-PD-1 n'a pas d'intérêt thérapeutique sur le modèle tumoral MCA205. Cependant, nous avons pu observer ici, comme d'autres avant nous (Jacquelot et al., 2017; Routy et al., 2018), que les cellules MCA205 WT sont particulièrement sensibles au

traitement avec l'anti-PD-1. Ces cellules ne constituent donc pas le meilleur modèle tumoral pour étudier la synergie d'une immunothérapie avec l'anti-PD-1.

## II – Propriétés immunomodulatrices de la madrasine et de ses dérivés

### 1. Contexte

En parallèle de notre étude de l'inhibiteur de l'épissage isoginkgetine et de son dérivé IP2, nous nous sommes intéressés à un autre composé inhibiteur du spliceosome, la madrasine. Cette molécule a pour la première fois été décrite par A. Pawellek *et al.* dans le cadre du criblage d'une banque de plus de 70 000 composés pour leur activité d'inhibition de l'épissage *in vitro* (Pawellek et al., 2014). Cette équipe a montré que le 2-((7-methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)amino)-5,6-dimethylpyrimidin-4(3H)-one **RNA**splicing inhibitor ou madrasine bloquait l'assemblage des sous unités du spliceosome au niveau du complexe A. A des concentrations de l'ordre de 10-30  $\mu$ M, le composé induit un arrêt dans le cycle cellulaire avec inhibition de la synthèse de l'ADN, une altération des corps de Cajal et la modulation de l'épissage de différents pré-mRNAs.

La madrasine a un avantage certain sur l'isoginkgetine : son accessibilité. Alors que l'isoginkgetine est extraite des feuilles du *Ginkgo biloba*, la madrasine est accessible par voie de synthèse à partir de la m-anisidine. Le développement de ce composé et de ces dérivés n'est donc pas conditionné à des questions d'approvisionnement et de marché. Nous avons montré que la madrasine, comme l'isoginkgetine, augmentait la présentation de l'épitope SL8 exprimé à partir d'un intron dans les cellules MCA205 globin-SL8-intron. Pour poursuivre notre étude *in vivo*, nous avons une nouvelle fois collaboré avec l'équipe CoSMIT dirigée par le Dr. M. Alami et le Pr. J.-D. Brion à la Faculté de Pharmacie de Châtenay Malabry afin d'obtenir des dérivés hydrosolubles qui conservent l'activité du composé original tout en améliorant sa biodisponibilité. Nous avons procédé à un criblage des composés *in vitro* suivi par une évaluation *in vivo* de l'activité antitumorale des composés les plus prometteurs.

Cette étude menée avec l'aide de V. Salgues dans notre équipe a fait l'objet du brevet international « Madrasin-derivative compounds, composition and uses thereof for treating cancer » disponible ci-après.

**2. Brevet : Madrasin-derivative compounds, composition and uses thereof for treating cancer (EP/2018/406499.7)**

## **MADRASIN-DERIVATIVE COMPOUNDS, COMPOSITION AND USES THEREOF FOR TREATING CANCER**

### **FIELD OF THE INVENTION**

5

The present disclosure generally relates to the fields of medicine and in particular cancer treatment. The invention more specifically relates to new compounds which are derivatives of Madrasin and are each typically for use as a medicament. In particular, the invention relates to the use of these new compounds for increasing the presentation, typically the production and presentation, of (antigenic) peptides, preferably Pioneer Translation Products (PTPs)-derived antigens by cells, in particular by cancer cells, or changing the immunopeptidome, in a subject, and inducing or stimulating an immune response in the subject. The immune response is typically directed against a tumor antigen, more generally against the cancerous tumour the subject is suffering of.

10

The present disclosure also relates to uses of such compounds, in particular to prepare a pharmaceutical composition and/or to allow or improve the efficiency of a therapy, in particular of a cancer therapy, in a subject in need thereof. Each of the compounds of the invention can indeed be advantageously used, in combination with at least one distinct anticancer agent, typically a chemotherapeutic drug, and/or with radiotherapy, for treating cancer, for preventing or treating cancer metastasis and/or for preventing cancer recurrence in a subject.

15

The invention also discloses methods for treating a disease, in particular cancer, for preventing or treating cancer metastasis and/or cancer recurrence, in a subject. The present invention in addition provides kits suitable for preparing a composition according to the present invention and/or for implementing the herein described methods.

20

### **BACKGROUND OF THE INVENTION**

25

All nucleated cells present antigenic peptides (APs) at their surface through the class I major histocompatibility complex (MHC-I) pathway. APs are 8 to 10 amino acids long and reflect the inherent cellular activity (Caron *et al.*). Because their presentation guides the surveillance of potentially dangerous elements by immune cells, mainly cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells (CTL) and CD4<sup>+</sup> T helper cells, APs are the targets of therapeutic anti-cancer vaccines currently developed. Despite promising, clinical trials results with therapeutic vaccines targeting tumor-associated antigens (TAA) haven't met their expectations. The main failures have been associated to immunosuppressive mechanisms and to a suboptimal choice of antigens (Mellman *et al.*; Burg *et al.*). One of the important events that drive tumors immunoselection, and that is correlated to poor prognosis, is the loss or the downregulation of MHC class I antigenic presentation by tumor cells (Watson *et al.*; Liu *et al.*). These last can escape CTL and natural killer cells recognition due to defects in components of the MHC

30

35

class I pathway (Leone *et al.*). Along with the overall decrease of MHC class I antigenic presentation, the nature of antigens presented at the cell surface, called the MHCI class I immunopeptidome (MIP), is of critical importance for immune recognition. In cancer where a specific TAA is identified and targeted with immunotherapy such as Her/neu in breast cancer or CEA in colon cancer, the loss of this TAA expression at the tumor cell surface leads to immune evasion (Lee *et al.*; Kmiecik *et al.*). To counteract that, current strategies aim at enlarging the range of targeted cancer peptide and restoring MHC antigenic presentation.

In order to understand the dynamic of the MIP, one could focus on the source of APs for the MHC class I presentation pathway. Endogenous APs were first thought to strictly come from the degradation of senescent proteins. However, models suggesting alternative sources have challenged this notion. In 1996, the group of J. Yewdell introduces the concept of the Defective ribosomal products (DRIPs) (Yewdell *et al.*), initially described as rapidly degraded products due to their unstable conformation. More recently, inventors have explored that concept from a different perspective showing that the major source of APs derive from a pioneer translation event that occurs before introns are spliced out and that is independent of the translation event of full-length proteins (Apcher *et al.*). Produced non-canonical peptides can therefore be derived from intronic sequence, 3' or 5' UTR regions as well as alternative reading frames. These polypeptides are described as Pioneer Translation Products (PTPs). The discovery of PTPs suggests the existence of a complex translational nuclear mechanism that partly aims at shaping the MIP by generating relevant and suitable polypeptides for the MHC class I pathway. Moreover, PTPs seem to play a role in the dynamic of cancer development. When inoculated in mouse, it has been shown that cancer cells presenting PTPs-derived antigens at their surface can be recognized by specific T-cells leading to tumor growth reduction. Moreover, purified PTPs containing a model epitope efficiently promote anti-cancer immune response when injected as a peptide vaccine in mice (Duvallat *et al.*).

Precursor-mRNA (pre-mRNA) splicing is catalyzed in the nucleus by the spliceosome, a conserved and dynamic multi-protein complex composed of five small nuclear RNAs (snRNAs) U1, U2, U4, U5 and U6 that are complexes with over 200 proteins. A growing number of studies report that the deregulation of the spliceosome complex entails aberrant splicing patterns in many cancers contributing to abnormal tumor cell proliferation and progression. Since 2011, recurrent spliceosome mutations have been reported in several cancers, including myelomonocytic leukemia, myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, breast cancers or multiple myeloma.

In recent years several microbial natural products and their synthetic analogues have been reported to inhibit the spliceosome, including the pladienolides B and D, spliceostatin A, FR901464, E7107, the Isoginkgetin and the madrasin. Inventors tested the potential effect as modulators of the antigenic presentation of some of each.

Here, they show that Madrasin and some of the derivatives they generated can be used as positive immunomodulators against cancer. They looked at the antigenic presentation of a PTPs-derived

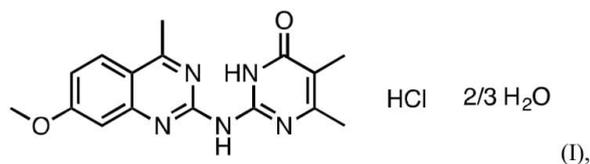
antigen model expressed in mouse cancer cell lines and observed that *in vitro* treatment with madrasin and the herein described different derivatives increases the presentation of the antigens. In addition, they showed that *in vivo* treatment with the madrasin hydrochloride (also herein identified as “Madr.HCl”, as EYP34 or as the compound of formula I) dissolved in water of sarcoma-bearing mice slows down tumor growth in an immune-dependent manner. In order to ameliorate its effect, they tested different madrasin derivatives that are soluble or not in water and observed that some were more potent inhibitors of mouse sarcoma growth than madrasin itself. Since in immunodeficient Nu/Nu mice, the natural product and the derivative have no effect on tumor growth they conclude that their effects are dependent on the immune response. Those results indicate that PTPs-derived antigenic presentation can be modulated by treatments and that splicing inhibition can boost the anti-cancer response. Inventors herein describe another mechanism of action of splicing inhibitors that can be used as positive immunomodulators to potentiate the anti-tumoral immune response.

Inventors now herein describe new compounds for use in the treatment of diseases, in particular in the treatment of cancer, in the prevention of cancer metastasis and/or in the prevention of cancer recurrence in a subject.

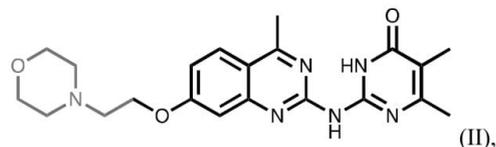
#### SUMMARY OF THE INVENTION

Inventors produced and herein describe for the first time the formulas of the following particular compounds derived from Madrasin:

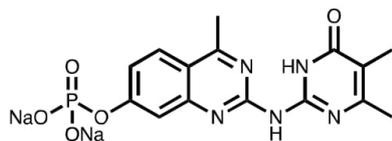
- Madrasin hydrochloride (also herein identified as “Madr.HCl”, as “EYP34” or as “compound of formula I”)



- 5,6-Dimethyl-2-((4-methyl-7-(2-morpholinoethoxy)quinazolin-2-yl)amino)pyrimidin-4(3H)-one (also herein identified as “EYP201”, “compound 6” or as “compound of formula II”)

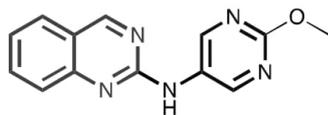


- Sodium 2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-4-methylquinazolin-7-yl phosphate (also herein identified as “EYP59”, “compound 7” or as “compound of formula III”)



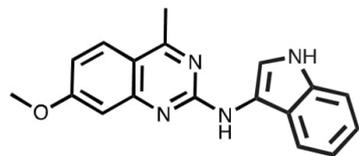
(III), wherein "Na" represents a "sodium" and the radical of formula -ONa designates a "sodium hydroxide",

- N-(2-Methoxypyrimidin-5-yl)quinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP281", "compound 32" or as "compound of formula IV")



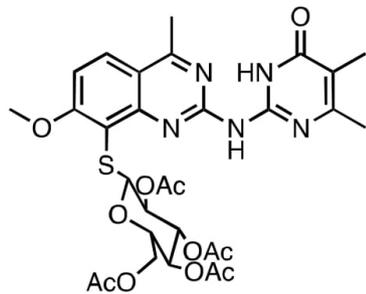
5 (IV),

- N-(1H-Indol-3-yl)-7-methoxy-4-methylquinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP165", "compound 57" or as "compound of formula V")



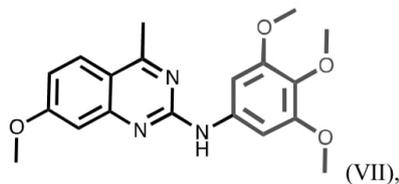
(V),

10 - ((1S,2S,4R,5S,6S)-5-Acetoxy-7,8-diacetyl-4-((2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-7-methoxy-4-methylquinazolin-8-yl)thio)-3,7λ3,8λ3-trioxabicyclo[4.2.0]octan-2-yl)methyl acetate (also herein identified as "EYP86", "compound 10" or as "compound of formula VI")



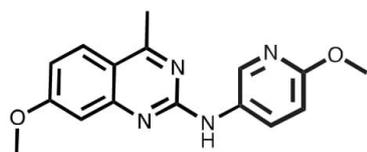
(VI), wherein the radical of formula -OAc designates a "Acetoxy group" of the structure CH<sub>3</sub>-C(=O)-O-

15 - 7-Methoxy-4-methyl-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl)quinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP188", "compound 42" or as "compound of formula VII")



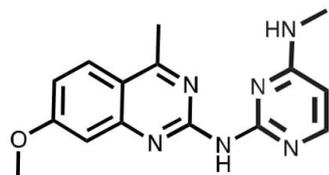
(VII),

- 7-Methoxy-N-(6-methoxypyridin-3-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP174", "compound 41" or as "compound of formula VIII")



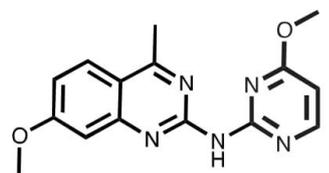
(VIII),

- N2-(7-Methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)-N4-methylpyrimidine-2,4-diamine (also herein identified as “EYP181”, “compound 49” or as “compound of formula IX”)



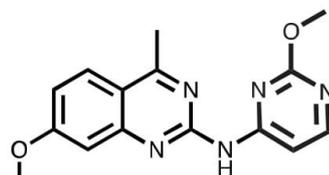
(IX),

5 - 7-Methoxy-N-(4-methoxypyrimidin-2-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (also herein identified as “EYP179”, “compound 50” or as “compound of formula X”)



(X), and

- 7-Methoxy-N-(2-methoxypyrimidin-4-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (also herein identified as “EYP190”, “compound 54” or as “compound of formula XI”)



10

(XI)

Each of these compounds, as well as any combination thereof, is herein described for use as a medicament.

15 Any of these compounds, as well as a stereoisomer thereof or as well as a pharmaceutically acceptable salt thereof, can advantageously be used as a medicament.

In a preferred aspect herein described, any of the herein above described compounds of formula (I) to (XI), or stereoisomer or pharmaceutically acceptable salt thereof, or any combination thereof, is for use in the treatment of a disease, in particular is for use in the treatment of a cancer, for use in the prevention of cancer metastasis and/or for use in the prevention of cancer recurrence, in a subject.

20 Further described is the *in vivo*, *in vitro* or *ex vivo* use of a compound of a formula selected from formula (I) to (XI) for inducing or increasing the presentation, typically the production and

presentation, of (antigenic) peptides, preferably Pioneer Translation Products (PTPs)-derived antigens by cells, in particular by cancer cells, or changing the immunopeptidome, in a subject.

The compound of a formula selected from formula (I) to (XI) allows the physician to prevent or control, preferably decrease, cancer cell proliferation by stimulating the subject's immune system. It is in addition advantageously capable of increasing the effectiveness of other cancer treatments. Inventors herein demonstrate that this compound is in addition capable of reducing the risk of metastasis and/or cancer recurrence.

Also herein described is a composition comprising such a compound of a formula selected from formula (I) to (XI) and a pharmaceutically acceptable carrier, preferably together with at least one distinct anticancer agent to be used simultaneously, separately or sequentially. Such a composition is typically for use for treating a disease, in particular for treating a cancer, for preventing cancer metastasis and/or for preventing cancer recurrence, in a subject.

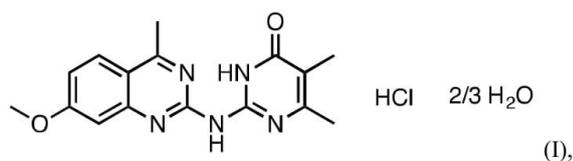
Also herein described is a method for treating a disease, in particular for treating cancer, in a subject, comprising a step of administering a compound, typically a compound of a formula selected from formula (I) to (XI), or a composition as herein described to the subject.

A kit is also described which comprises a compound of a formula selected from formula (I) to (XI) and preferably at least one distinct anticancer agent in distinct containers, as well as uses thereof, in particular to prepare a composition as herein described.

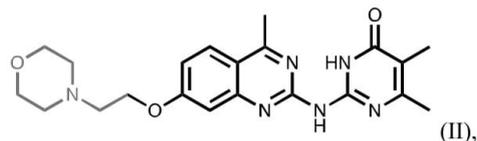
## 20 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Inventors generated Madrasin derivatives which are described for the first time in the context of the present invention and are more precisely identified below as compounds of formulas (I) to (XI):

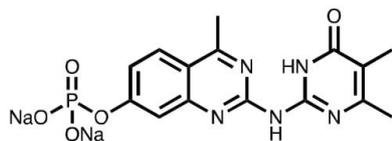
- Madrasin hydrochloride (also herein identified as "Madr.HCl", as "EYP34" or as "compound of formula I")



- 5,6-Dimethyl-2-((4-methyl-7-(2-morpholinoethoxy)quinazolin-2-yl)amino)pyrimidin-4(3H)-one (also herein identified as "EYP201", "compound 6" or as "compound of formula II")

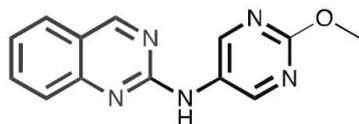


- Sodium 2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-4-methylquinazolin-7-yl phosphate (also herein identified as "EYP59", "compound 7" or as "compound of formula III")



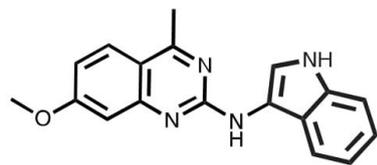
(III), wherein "Na" represents a "sodium" and the radical of formula -ONa designates a "sodium hydroxide",

- N-(2-Methoxypyrimidin-5-yl)quinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP281", "compound 32" or as "compound of formula IV")



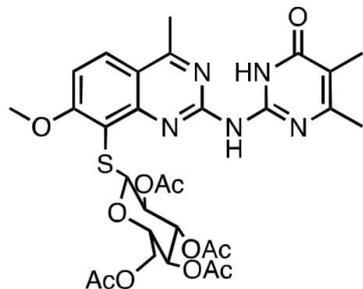
5 (IV),

- N-(1H-Indol-3-yl)-7-methoxy-4-methylquinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP165", "compound 57" or as "compound of formula V")



(V),

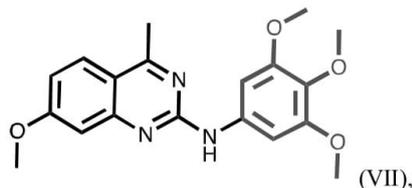
10 - ((1S,2S,4R,5S,6S)-5-Acetoxy-7,8-diacetyl-4-((2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-7-methoxy-4-methylquinazolin-8-yl)thio)-3,7λ3,8λ3-trioxabicyclo[4.2.0]octan-2-yl)methyl acetate (also herein identified as "EYP86", "compound 10" or as "compound of formula VI")



(VI), wherein the radical of formula -OAc designates a

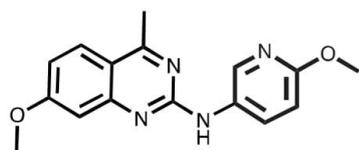
"Acetoxy group" of the structure CH<sub>3</sub>-C(=O)-O-

15 - 7-Methoxy-4-methyl-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl)quinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP188", "compound 42" or as "compound of formula VII")



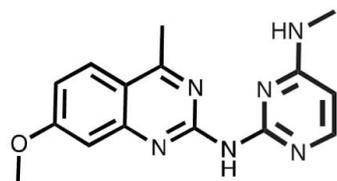
(VII),

- 7-Methoxy-N-(6-methoxypyridin-3-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP174", "compound 41" or as "compound of formula VIII")



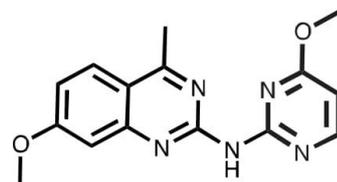
(VIII),

- N2-(7-Methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)-N4-methylpyrimidine-2,4-diamine (also herein identified as "EYP181", "compound 49" or as "compound of formula IX")



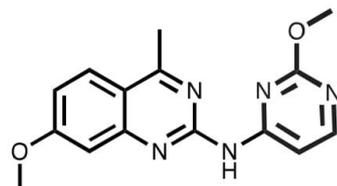
(IX),

5 - 7-Methoxy-N-(4-methoxypyrimidin-2-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP179", "compound 50" or as "compound of formula X")



(X), and

- 7-Methoxy-N-(2-methoxypyrimidin-4-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (also herein identified as "EYP190", "compound 54" or as "compound of formula XI")



10

(XI)

Any of the herein above described compound of formula (I) to (XI), as well as a stereoisomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof, can advantageously be used as a medicament.

15 As used herein, the term "*pharmaceutically acceptable*" refers to compositions, compounds, salts and the like that are, within the scope of sound medical judgment, suitable for contact with the tissues of the subject, or which can be administered to the subject, without excessive toxicity or other complications commensurate with a reasonable benefit/risk ratio. For instance, pharmaceutically acceptable salts encompass sodium, potassium, chloride, ammonium, acetate salts and the like.

20

Inventors herein demonstrate that the compounds of formulas (I) to (XI) can advantageously be used as positive immunomodulators, in particular against cancer.

Inventors looked at the antigenic presentation of a PTPs-derived antigen model expressed in mouse cancer cell lines and observed that their *in vitro* treatment with Madrasin and, more preferably a compound of a formula selected from formula (I) to (XI), increases the presentation of this antigen. In addition, they showed that *in vivo* treatment with the Madrasin dissolved in DMSO of sarcoma-bearing mice slows down tumor growth in an immune-dependent manner. In order to ameliorate its effect, they tested the herein described Madrasin derivatives that are soluble in water and surprisingly observed that they are far more potent inhibitors of cancer growth than Madrasin itself. Since in immunodeficient Nu/Nu mice, the natural product and the derivative have no effect on tumor growth they concluded that their effects are dependent on the immune response. Those results demonstrate that PTPs-derived antigenic presentation can be modulated and inventors provide new promising molecules for market development which can be used to boost in particular the anti-cancer response and treat cancer contrary to other derivatives of Madrasin.

In a preferred aspect herein described, the compound of a formula selected from formula (I) to (XI), namely the compound of formula (I), (II), (III), (V), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X) or (XI) (also herein identified as the "compounds of interest"), is for use in the treatment of a disease, in particular of a cancer, for use in the prevention of cancer metastasis and/or for use in the prevention of cancer recurrence, in a subject.

In another preferred aspect herein described, the compound of a formula selected from formula (I) to (XI) is for use for stimulating an anti-cancer immune response in a subject in need thereof.

In a further preferred aspect, the compound of a formula selected from formula (I) to (XI) is for use for inducing or increasing the presentation, typically the production and presentation, of Pioneer Translation Products (PTPs)-derived antigens by cancer cells, or changing the immunopeptidome, in a subject.

The compounds of the invention can be obtained by methods well-known by the skilled artisan such as hemi-synthesis or total synthesis. Examples of methods for producing the compounds of interest are herein described in the experimental part and further illustrated on figures 8 and 9. The compounds of formulas (I) to (XI) are artificial products which cannot be found as such in nature.

The compound of formulas (I) to (XI) can be typically prepared from Madrasin which has been described as a permeant inhibitor of pre-mRNA splicing. The compound of formula (I) can be prepared by chemical synthesis by using conventional chemical reactions.

A further object of the invention is the use of a compound of a formula selected from formula (I) to (XI) (or a stereoisomer or a pharmaceutically acceptable salt thereof) for decreasing the resistance of a

cancer or subject suffering of cancer with respect to a distinct anticancer agent, typically a distinct chemotherapeutic agent.

5 Also herein described is a compound of a formula selected from formula (I) to (XI), according to the invention (or a stereoisomer or a pharmaceutically acceptable salt thereof), or a composition comprising such a compound and a pharmaceutically acceptable carrier, for use, in combination with at least one distinct anticancer agent, typically a distinct chemotherapeutic drug, and/or with radiotherapy, for treating a disease, in particular for treating a cancer, for preventing cancer metastasis and/or for preventing cancer recurrence in a subject.

10

The term “*subject*” refers to any subject, preferably a mammal.

Examples of mammals include humans and non-human animals such as, without limitation, domesticated animals (e.g., cows, sheep, cats, dogs, and horses), non-human primates (such as monkeys), rabbits, and rodents (e.g., mice and rats). The treatment is preferably intended for a human being in need thereof, whatever its age or sex.

15 The term “*subject*” typically designates a patient, in particular a patient having a tumor. Unless otherwise specified in the present disclosure, the tumor is a cancerous or malignant tumor. In a particular aspect, the subject is a subject undergoing a treatment of cancer such as chemotherapy and/or radiotherapy, or a subject at risk, or suspected to be at risk, of developing a cancer.

20 The subject is, for example a human being suffering of a cancer and resistant to cancer treatment, typically to chemotherapy.

The subject may have been exposed to part of a complete conventional treatment protocol, for example to at least one cycle of the all treatment protocol, for example two cycles of the all treatment protocol.

25

The cancer or tumor may be any kind of cancer or neoplasia. The tumor is typically a solid tumor, in particular of epithelial, neuroectodermal or mesenchymal origin. The cancer is also typically selected from a carcinoma, sarcoma, lymphoma, germ cell tumor, blastoma, leukemia and multiple myeloma, preferably from a carcinoma, sarcoma, blastoma, lymphoma, leukemia and multiple myeloma. The cancer can be a metastatic cancer or not.

30

The cancer can for example be selected from, without being limited to, the group consisting of chronic myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia (Ph<sup>+</sup> ALL), Hodgkin's disease, Hodgkin's or non-Hodgkin lymphoma, squamous cell carcinoma, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, glioma, gastrointestinal cancer, renal cancer, ovarian cancer, liver cancer, colorectal cancer, endometrial cancer, kidney cancer, prostate cancer, thyroid cancer, neuroblastoma, brain cancer, central nervous system cancer, pancreatic cancer, glioblastoma multiforme, cervical cancer, stomach cancer, bladder cancer,

35

malignant hepatoma, breast cancer, colon carcinoma, head and neck cancer, gastric cancer, germ cell tumor, pediatric sarcoma, rhabdomyosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, soft tissue sarcoma, sinonasal NK/T-cell lymphoma, myeloma, melanoma, multiple myeloma, acute myelogenous leukemia (AML), and chronic lymphocytic leukemia.

- 5 In a preferred embodiment, the cancer is selected from the group consisting of lung cancer, breast cancer, genito-urinary cancer (such as prostate cancer, bladder cancer, testis cancer, uterine cervix cancer or ovaries cancer) and sarcoma (such as osteosarcoma or soft tissue sarcoma, including pediatric soft tissue sarcoma, neuroblastoma, myeloma and melanoma).

In a particular embodiment, the cancer is a sarcoma.

- 10 More preferably, the cancer is selected from melanoma, lung cancer (including non-small-cell lung carcinoma (or NSCLC) and small-cell lung carcinoma (or SCLC)) and breast cancer.

Even more preferably, the carcinoma is a melanoma or a lung cancer.

In an aspect, the cancer is a lung cancer, typically a small-cell lung cancer or a non-small cell lung cancer.

- 15 In another aspect, the cancer is a leukemia, typically an acute myelogenous leukemia (AML) or a chronic lymphocytic leukemia.

In a further aspect, the cancer is a colon cancer, typically a colon carcinoma. The cancer may also be a colorectal cancer.

In a further aspect, the cancer is a pediatric cancer typically a pediatric sarcoma, lymphoma, leukemia,

- 20 neuroblastoma, brain cancer, or central nervous system cancer.

In a particular aspect herein described, the anticancer agent is selected from a chemotherapeutic agent, an immune checkpoint blocker and an anti-cancer vaccine (also herein identified as "cancer vaccine"). These agents are typically considered as "conventional" agents for treating cancer.

- 25 The chemotherapeutic agent is typically an agent selected for example from an antitumor/cytotoxic antibiotic, an alkylating agent, an antimetabolite, a topoisomerase inhibitor, a mitotic inhibitor, a platin based component, a specific kinase inhibitor, an hormone, a cytokine, an antiangiogenic agent, an antibody, a DNA methyltransferase inhibitor and a vascular disrupting agent.

- 30 The antitumor agent or cytotoxic antibiotic can for example be selected from an anthracycline (e.g. doxorubicin, daunorubicin, adriamycine, idarubicin, epirubicin, mitoxantrone, valrubicin), actinomycin, bleomycin, mitomycin C, plicamycin and hydroxyurea.

The alkylating agent can for example be selected from mechlorethamine, cyclophosphamide, melphalan, chlorambucil, ifosfamide, temozolomide busulfan, N-Nitroso-N-methylurea (MNU), carmustine (BCNU), lomustine (CCNU), semustine (MeCCNU), fotemustine, streptozotocin,

- 35

dacarbazine, mitozolomide, thiotepa, mytomyacin, diaziquone (AZQ), procarbazine, hexamethylmelamine and uramustine

- 5 The antimetabolite can for example be selected from a pyrimidine analogue (e.g. a fluoropyrimidine analog, 5-fluorouracil (5-FU), floxuridine (FUDR), cytosine arabinoside (Cytarabine), Gemcitabine (Gemzar®), capecitabine); a purine analogue (e.g. azathioprine, mercaptopurine, thioguanine, fludarabine, pentostatin, cladribine, clofarabine); a folic acid analogue (e.g. methotrexate, folic acid, pemetrexed, aminopterin, raltitrexed, trimethoprim, pyrimethamine).
- 10 The topoisomerase inhibitor can for example be selected from camptothecin, irinotecan, topotecan, amsacrine, etoposide, etoposide phosphate and teniposide.
- 15 The mitotic inhibitor can for example be selected from a taxane [paclitaxel (PG-paclitaxel and DHA-paclitaxel) (Taxol®), docetaxel (Taxotère®), larotaxel, cabazitaxel, ortataxel, tesetaxel, or taxoprexin]; a spindle poison or a vinca alkaloid (e.g. vincristine, vinblastine, vinorelbine, vindesine or vinflunine); mebendazole; and colchicine.
- 20 The platin based component can for example be selected from platinum, cisplatin, carboplatin, nedaplatin, oxaliplatin, satraplatin and triplatin tetranitrate.
- 25 The specific kinase inhibitor can for example be selected from a BRAF kinase inhibitor such as vemurafenib; a MAPK inhibitor (such as dabrafenib); a MEK inhibitor (such as trametinib); and a tyrosine kinase inhibitor such as imatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib or carbozantinib.
- 30 Tamoxifen, an anti-aromatase, or an anti-estrogen drug can also typically be used in the context of hormone therapy.
- A cytokine usable in the context of an immunotherapy can be selected for example from IL-2 (Interleukine-2), IL-11 (Interleukine-11), IFN (Interferon) alpha (IFN $\alpha$ ), and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).
- 35 The anti-angiogenic agent can be selected for example from bevacizumab, sorafenib, sunitinib, pazopanib and everolimus.
- The antibody, in particular the monoclonal antibody (mAb) can be selected from a anti-CD20 antibody (anti-pan B-Cell antigen), anti-Her2/Neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2/NEU) antibody; an antibody targeting cancer cell surface (such as rituximab and alemtuzumab); a antibody

targeting growth factor (such as bevacizumab, cetuximab, panitumumab and trastuzumab); a agonistic antibody (such as anti-ICOS mAb, anti-OX40 mAb, anti-41BB mAb); and an immunconjugate (such as 90Y-ibritumomab tiuxetan, 131I-tositumomab, or ado-trastuzumab emtansine).

- 5 A DNA methyltransferase inhibitor can for example be selected from 2'-deoxy-5-azacytidine (DAC), 5-azacytidine, 5-aza-2'- deoxycytidine, 1 -[beta]-D-arabinofuranosyl-5-azacytosine and dihydro-5-azacytidine.

- 10 A vascular disrupting agent can for example be selected from a flavone acetic acid derivative, 5,6-dimethylxanthenone-4- acetic acid (DMXAA) and flavone acetic acid (FAA).

Other chemotherapeutic drugs include a proteasome inhibitor (such as bortezomib), a DNA strand break compound (such as tirapazamine), an inhibitor of both thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase (such as xcytrin), and an enhancer of the Th1 immune response (such as thymalfasin).

15

In a preferred embodiment, the chemotherapeutic drug or agent is selected from an antitumor/cytotoxic antibiotic, an alkylating agent, an antimetabolite, a topoisomerase inhibitor, a mitotic inhibitor, a platin based component, a specific kinase inhibitor, an antiangiogenic agent, an antibody and a DNA methyltransferase inhibitor.

20

An immune checkpoint blocker is typically an antibody targeting an immune checkpoint. Such an immune checkpoint blocker can be advantageously selected from anti-CTLA4 (ipilimumab and Tremelimumab), anti-PD-1 (Nivolumab and Pembrolizumab), anti-PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab, and Avelumab), anti-PD-L2 and anti-Tim3.

25

The cancer vaccine can for example be selected from a vaccine composition comprising (antigenic) peptides, in particular PTPs; a Human papillomavirus (HPV) vaccine (such as Gardasil®, Gardasil9®, and Cervarix®); a vaccine stimulating an immune response to prostatic acid phosphatase (PAP) sipuleucel-T (Provenge®); an oncolytic virus; and talimogene laherparepvec (T-VEC or Imlygic®).

30

In another particular aspect, the (“conventional”) cancer treatment is an irradiation (also herein identified as “radiotherapy”). The radiotherapy typically involves rays selected from X-rays (“XR”), gamma rays and/or UVC rays.

- 35 The treatment which can include several anticancer agents is selected by the cancerologist depending on the specific cancer to be prevented or treated.

A particular melanoma is a melanoma conventionally treated with ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, IFN $\alpha$ , dacarbazine, a BRAF inhibitor, dabrafenib, trametinib, sorafenib, temozolomide, electrochemotherapy, TNF $\alpha$  and/or fotemustine.

5 In a particular embodiment, the melanoma is a melanoma resistant to the previously described cytotoxic conventional therapies.

A particular breast cancer is a breast cancer conventionally treated with an anthracycline, a taxane, trastuzumab, an anti-PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase), an anti-PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), a mTOR (mammalian Target of Rapamycin) inhibitor, vinorelbine, gemcitabine, an  
10 antioestrogen, and/or an antiaromatase, before or after a surgical step to remove breast tumor, preferably before such a surgical step.

In a particular embodiment, the breast cancer is a breast cancer resistant to the previously described conventional therapies.

15 A particular lung cancer is a lung cancer conventionally treated with XR and either platine or perimetrexed.

A particular early stage NSCLC is an NSCLC conventionally treated with paclitaxel, docetaxel gemcitabine, vinorelbine, etoposide, taxane, avastin [anti-VEGF (Vascular endothelial growth factor) antibody], erlotinib and/or gefitinib. In a particular embodiment, the lung cancer is resistant to  
20 conventional therapies.

A particular colon cancer, also known as a colorectal cancer or bowel cancer, is conventionally treated with an antimetabolite (5-FU, raltitrexed), a platin based component (oxaliplatin), a topoisomerase inhibitor (irinotecan), an antibody targeting growth factor (bevacizumab, cetuximab, panitumumab)  
25 after a surgical step to remove breast tumor.

The present disclosure further relates to the use of a compound of a formula selected from formula (I) to (XI) according to the invention (or a stereoisomer or a pharmaceutically acceptable salt thereof) to prepare a pharmaceutical composition or medicament, said composition being capable of treating a disease, in particular a cancer, or of improving the efficiency of a therapy, in a subject in need thereof  
30 by stimulating the subject's immune system.

In a particular aspect, the compound is selected from the compound of formula II, III, IV, V, VI and VII, and the cancer is a sarcoma.

In another particular aspect, the compound is selected from the compound of formula II, III, IV, V, VIII, IX, X and XI, and the carcinoma is a melanoma.

35

The compound of the invention can in particular be advantageously used, in combination with at least one distinct anti-cancer agent as described previously or any other therapeutically active compound,

and/or with radiotherapy, for treating a disease, in particular for treating a cancer, for preventing cancer metastasis and/or for preventing cancer recurrence, in a subject.

Also herein described is thus a composition comprising, typically as a combined preparation, a compound of a formula selected from formula (I) to (XI) and a pharmaceutically acceptable carrier, preferably together with at least one distinct therapeutic agent, in particular anticancer agent, for simultaneous, separate or sequential use in the treatment of the disease, in particular of the cancer.

Herein described are also (i) a method for treating a disease, in particular a cancer, (ii) a method for increasing the sensitivity of a disease, in particular a cancer, to a therapeutic/ anticancer agent, and (iii) a method for decreasing the resistance of a disease/cancer with respect to a therapeutic/ anticancer agent, each of said methods comprising administering a subject in need thereof with an effective amount, typically a therapeutically effective amount, of at least one compound of a formula selected from formula (I) to (XI), or a pharmaceutical composition as defined above, preferably together with another therapeutic/anticancer agent classically used in the treatment of the disease/cancer as herein described (as a combined preparation).

In another particular aspect, said method further comprises administering an effective amount of another therapeutically active compound for treating a disease/cancer or for preventing or treating a disease/cancer treatment side effect.

As used herein, "treatment" or "treat" refers to therapeutic intervention in an attempt to alter the natural course of the subject being treated, and is typically performed for curative purpose. Desirable effects of treatment include, but are not limited to, preventing recurrence of disease, alleviation of symptoms, and diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission or improved prognosis. In preferred embodiments, compositions and methods of the invention are used to delay development of a cancer or to slow the progression of a cancer, typically of tumor growth.

Typically, the treatment will induce a therapeutic response of the immune system of the subject, typically CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> T cells response(s).

By inducing a T cell response is typically meant herein that a T cell response directed towards a certain antigen is elicited. Before said induction, said T cell response was not present, or below detection levels or not functional. By enhancing a T cell response is meant herein that the overall action of T cells directed towards a certain antigen is made higher and/or more efficient compared to the overall action of said T cells before said enhancement. For instance, after said enhancement more T cells directed towards said antigen may be generated. As a result, the action of the additionally generated T cells increases the overall action against said antigen. Alternatively, said enhancement may comprise the increment of the action of T cells directed towards said antigen. Said T cells may for

instance react stronger and/or quicker with said antigen. Of course, the result of said enhancement may be generation of additional T cells together with increment of the action of said T cells. Alternatively, said enhancement may comprise generation of additional T cells, or increment of the action of T cells, only.

5

Another object herein described relates to a method of producing an immune response in a subject, typically against a specific target, preferably a tumor antigen or cancer/tumor cell or tissue, the method comprising injecting to said subject a compound of a formula selected from formula (I) to (XI) according to the invention or composition according to the invention comprising such a compound, typically in an effective amount.

10

The detection of a therapeutic immune response can be easily determined by the skilled person thanks to technologies such as ELISA, ELISPOT, delayed type hypersensitivity response, intracellular cytokine staining, and/or extracellular cytokine staining.

15

As used herein, “*an effective amount or dose*” or “*a therapeutically effective amount or dose*” refers to an amount of the compound of the invention which removes, slows down the disease, in particular the cancer, or reduces or delays one or several symptoms or disorders caused by or associated with said disease in the subject, or which induce a measurable immune response in the subject, who is preferably a human being. The effective amount, and more generally the dosage regimen, of the compound of the invention and pharmaceutical compositions thereof may be determined and adapted by the one skilled in the art. An effective dose can be determined by the use of conventional techniques and by observing results obtained under analogous circumstances. The therapeutically effective dose of the compound of the invention will vary depending on the disease to be treated, its gravity, the route of administration, any co-therapy involved, the patient's age, weight, general medical condition, medical history, etc.

20

25

Typically, the amount of the compound to be administrated to a patient may range from about 0.01 mg/kg to 500 mg/kg of body weight for a human patient. In a particular embodiment, the pharmaceutical composition according to the invention comprises 0.1 mg/kg to 100 mg/kg of the compound of the invention, for instance from 0.5 mg/kg to 10 mg/kg.

30

In a particular aspect, the compounds of interest of the invention can be administered to the subject by parenteral route, oral route, or intravenous (IV), intratumoral (IT) or intraperitoneal (IP) injection. The compound of the invention may be administered to the subject daily (one time a day) during several consecutive days, for example during 2 to 10 consecutive days, preferably from 3 to 6 consecutive days. Said treatment may be repeated during 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7 weeks, or every two or three weeks or every one, two or three months. Alternatively, several treatment cycles can be performed, optionally with a break period between two treatment cycles, for instance of 1, 2, 3, 4 or 5

35

weeks. Anyone of the herein described compounds of the invention can for example be administered as a single dose once a week, once every two weeks, or once a month. The treatment may be repeated one or several times per year.

5 Doses are administered at appropriate intervals which can be determined by the skilled person. The amount chosen will depend on multiple factors, including the route of administration, duration of administration, time of administration, the elimination rate of the selected compound having a formula selected from formula (I) to (XI), or of the various products used in combination with said compound, the age, weight and physical condition of the patient and his/her medical history, and any other information known in medicine.

10

The administration route can be performed by various routes. For example, it can be oral or parenteral. It is typically performed by systemic injection, e.g., intravenous, intra-muscular, intra-peritoneal, intra-tumoral, sub-cutaneous, etc. The pharmaceutical composition is adapted for one or several of the above-mentioned routes. The pharmaceutical composition is preferably administered by injection or  
15 by intravenous infusion of suitable sterile solutions, or in the form of liquid or solid doses via the alimentary canal.

The pharmaceutical composition can be formulated as solutions in pharmaceutically compatible solvents or vehicles, or as pills, tablets, capsules, powders, suppositories, etc. that contain solid  
20 vehicles in a way known in the art, possibly through dosage forms or devices providing sustained and/or delayed release. For this type of formulation, an agent such as cellulose, lipids, carbonates or starches are used advantageously.

Agents or vehicles that can be used in the formulations (liquid and/or injectable and/or solid) are excipients or inert vehicles, i.e. pharmaceutically inactive and non-toxic vehicles.

25 Mention may be made, for example, of saline, physiological, isotonic and/or buffered solutions, compatible with pharmaceutical use and known to those skilled in the art. The compositions may contain one or more agents or vehicles chosen from dispersants, solubilizers, stabilizers, preservatives, etc.

30 Formulations of the present invention suitable for oral administration may be in the form of discrete units as capsules, sachets, tablets or lozenges, each containing a predetermined amount of the active ingredient; in the form of a powder or granules; in the form of a solution or a suspension in an aqueous liquid or non-aqueous liquid; or in the form of an oil-in-water emulsion or a water-in-oil emulsion.

35 Formulations suitable for parenteral administration conveniently comprise a sterile oily or aqueous preparation of the active ingredient which is preferably isotonic with the blood of the recipient. Every such formulation can also contain other pharmaceutically compatible and non-toxic auxiliary agents, such as, e.g. stabilizers, antioxidants, binders, dyes, emulsifiers or flavouring substances.

The formulations of the present invention comprise an active ingredient, a compound having a formula selected from formula (I) to (XI) according to the invention (or a stereoisomer or a pharmaceutically acceptable salt thereof), in association with a pharmaceutically acceptable carrier and optionally with  
 5 other active or therapeutic ingredients. The carrier must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulations and not deleterious to the recipient thereof. Methods for the safe and effective administration of most of these anti-cancer agents are known to those skilled in the art. In addition, their administration is described in the standard literature.

10 Another object of the invention is a kit comprising at least one compound having a formula selected from formula (I) to (XI) according to the invention (or a stereoisomer or a pharmaceutically acceptable salt thereof), and preferably at least one distinct therapeutic agent, in particular anticancer agent, typically chemotherapeutic drug, in distinct containers. The kit can further comprise instructions for  
 15 preparing a composition according to the invention, for carrying out anyone of the herein described method, for example for treating a disease, in particular a cancer, for preventing or treating cancer metastasis and/or for preventing or treating cancer recurrence, in a subject.

In a particular embodiment, the present invention relates to the use of a kit according to the invention to prepare a composition as herein described.

20

In another particular embodiment, the kit is suitable for implementing anyone of the herein described method, in particular a method for treating cancer, for preventing cancer metastasis and/or for preventing cancer recurrence in a subject.

25 Further aspects and advantages of the present invention will be disclosed in the following experimental section and figures which shall be considered as illustrative only.

#### LEGENDS TO THE FIGURES

30 **Figure 1A and 1B: Madrasin and Madra.HCl treatment increase intron-derived antigen presentation in cancer cells.**

B3Z specific T-cell activation in MCA205 sarcoma cells and B16F10 melanoma cells expressing the intron-derived SL8 antigen after treatment with 5  $\mu$ M or 10  $\mu$ M **(A)** Madrasin **(B)** Madra.HCl. Free SL8 peptide was added in each condition to ensure that T-cell assays were carried out in nonsaturated  
 35 conditions and that the expression of MHC-I molecules was taking into account in the results. Each graph is one representative of at least three independent experiments. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (unpaired student t test).

**Figure 1C-1F: Madra.HCl slows down the growth of tumor bearing intron-derived SL8 epitope**

Wild type MCA205 sarcoma cells or MCA205 sarcoma cells expressing the globin-SL8-intron construct (MCA205 globin-SL8-intron) were subcutaneously inoculated into the flank of immunocompetent C57BL/6 mice subsequently injected intraperitoneally with 20 mg/kg or 40 mg/kg of Madra.HCl at day 4, 7, 10 and 14 post tumor inoculation. Tumor size was assessed every 3 to 4 days until the established ethical endpoints were reached. The panel C represents the growth curve of MCA205 sarcoma cells expressing the globin-SL8-intron construct (MCA205 globin-SL8-intron), the panel D represents the tumor size at day 25. The panel E represents the growth curve of Wild type MCA205 sarcoma cells (MCA205 WT), the panel F represents the tumor size at day 21. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (ANOVA with Tukey's multiple comparison test comparing all groups).

**Figure 1G: Madra.HCl extends overall survival of mice bearing intron-derived SL8-expressing tumors**

Kaplan-Meier survival curve of mice injected subcutaneously with MCA205 globin-SL8-intron and subsequently treated intraperitoneally with Madra.HCl at 20 mg/kg or 40 mg/kg, 4, 7, 10 and 14 days post tumor inoculation.

**Figure 1H: Madra.HCl induces a long-lasting specific antitumor response**

Growth curve of MCA205 globin-SL8-intron cells and B16F10 WT cells inoculated at day 100 into the right and the left flank, respectively, of C57BL/6 mice which experienced complete tumor regression after treatment with Madra.HCl.

**Figure 2: Test MTT for each derivatives of Madrasin**

MTT assay performed on MCA205 (A) or B16F10 (B) cells treated with increase doses of the different derivatives of Madrasin. Data are expressed as half maximal inhibitory concentration (IC50) of the different derivatives. The IC50 represents the concentration of the tested compounds that is required for 50% inhibition of the cell viability compared to the control condition. A threshold of 60 $\mu$ m is notified. It will be the maximum dose used for all the compounds that do not show any cell death.

**Figure 3: Derivatives of Madrasin that increase antigen presentation in both murine cell lines.**

B3Z specific T-cell activation in MCA205 and B16F10 expressing the intron-derived SL8 antigen after treatment with 60 $\mu$ M (A) of EYP59 (compound 7), 20 $\mu$ M (B) of EYP201 (compound 6), 60 $\mu$ M (C) of EYP165 (compound 57) or 50 $\mu$ M (D) of EYP281 (compound 32). Free SL8 peptide was added in each condition to ensure that T-cell assays were carried out in nonsaturated conditions and that the expression of MHC-I molecules was taken into account in the results. Each graph is one representative of at least three independent experiments. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (unpaired student t test).

**Figure 4: Derivatives of Madrasin that increase antigen presentation only in MCA205 sarcoma cell line.**

5 B3Z specific T-cell activation in MCA205 expressing the intron-derived SL8 antigen after treatment with 60 $\mu$ M (**A**) of EYP188 (compound **42**), 50 $\mu$ M (**B**) of EYP86 (compound **10**). Free SL8 peptide was added in each condition to ensure that T-cell assays were carried out in nonsaturated conditions and that the expression of MHC-I molecules was taken into account in the results. Each graph is one representative of at least three independent experiments. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (unpaired student t test).

10 **Figure 5: Derivatives of Madrasin that increase antigen presentation only in B16F10 melanoma cell line.**

B3Z specific T-cell activation in MCA205 expressing the intron-derived SL8 antigen after treatment with 20 $\mu$ M (**A**) of EYP174 (compound **41**), 20 $\mu$ M (**B**) of EYP179 (compound **50**), 60 $\mu$ M (**C**) of EYP190 (compound **54**) and 10 $\mu$ M (**D**) of EYP181 (compound **49**). Free SL8 peptide was added in each condition to ensure that T-cell assays were carried out in nonsaturated conditions and that the expression of MHC-I molecules was taking into account in the results. Each graph is one representative of at least three independent experiments. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (unpaired student t test).

**Figure 6: Derivatives of Madrasin that do not increase antigen presentation in both tumor cell lines.**

20 B3Z specific T-cell activation in MCA205 expressing the intron-derived SL8 antigen after treatment with 60 $\mu$ M (**A**) of EYP177 (compound **46**), 60 $\mu$ M (**B**) of EYP156 (compound **43**), 10 $\mu$ M (**C**) of EYP113 (compound **11**) and 20 $\mu$ M (**D**) of EYP102 (compound **9**). Free SL8 peptide was added in each condition to ensure that T-cell assays were carried out in nonsaturated conditions and that the expression of MHC-I molecules was taking into account in the results. Each graph is one representative of at least three independent experiments. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (unpaired student t test).

**Figure 7: EYP59 (compound 7) slows down the growth of MCA-WT sarcoma and MCA-intron-SL8.**

30 Wild type MCA205 sarcoma cells or MCA205 sarcoma cells expressing the globin-SL8-intron construct (MCA205 globin-SL8-intron) were subcutaneously inoculated into the flank of immunocompetent C57BL/6 mice subsequently injected intraperitoneally with 20 mg/kg of EYP59 at day 4, 7, 10 and 14 post tumor inoculation. Tumor size was assessed every 3 to 4 days until the established ethical endpoints were reached (**A**). The upper panel **B** represents the growth curve of MCA205 sarcoma cells expressing the globin-SL8-intron construct (MCA205 globin-SL8-intron), the lower panel **B** represents the tumor size at day 23. The upper panel **C** represents the growth curve of Wild type MCA205 sarcoma cells (MCA205 WT), the lower panel **C** represents the tumor size at day

19. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (ANOVA with Tukey's multiple comparison test comparing all groups).

**Figure 8. Synthesis of Madrasin and Madrasin hydrochloride (Madra.HCl).**

**Figure 9. Pharmacomodulation of Madrasin and synthesis of Madrasin's derivatives.**

5

## EXAMPLES

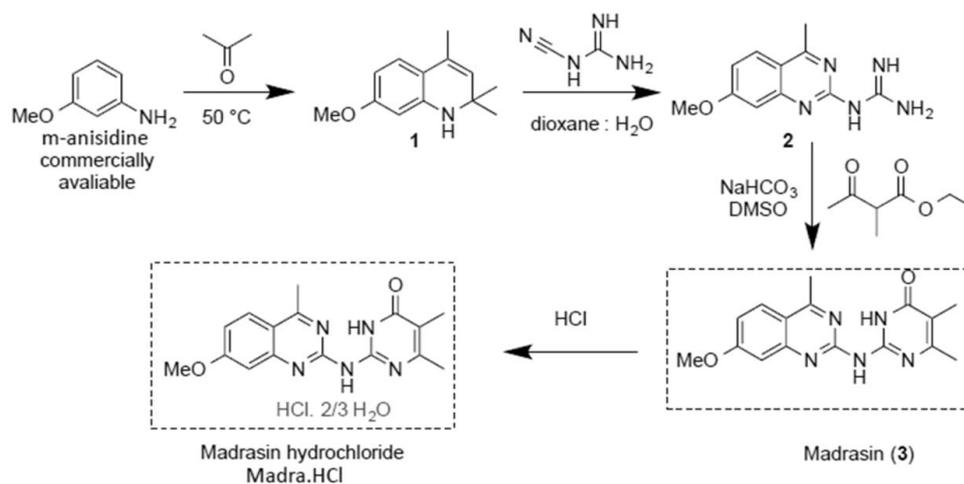
### MATERIALS & METHODS

#### Cell culture

- 10 MCA205 mouse sarcoma cell line is cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium (Life Technologies) in the presence of 1% glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino-acids, 1% penicillin/streptomycin and 10% FBS (Life Technologies). B16F10 mouse melanoma cell line is cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in DMEM medium (Life Technologies) containing 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 10% FCS under standard conditions. Stable MCA205-Globin-SL8-intron
- 15 cell line are cultured under the same condition as MCA205 cell line with additional 500µg/ml G418 (Life Technologies) for selection. Stable B16F10-Globin-SL8-intron cell line are cultured under the same condition as B16F10 cell line with additional 500µg/ml G418 (Life Technologies) for selection. The SL8/Kb-specific (B3Z) T-cell reporter hybridoma are cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium (Life Technologies) in the presence of 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 50
- 20 µM β-mercaptoéthanol and 10% FCS.

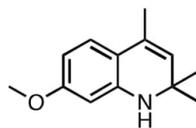
#### Schema of synthesis of madrasin and all the derivatives compounds

##### 1) Synthesis of Madrasin and Madrasin Hydrochloride (Madra.HCL)



25

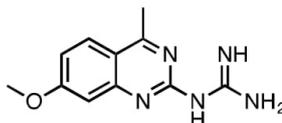
a. **7-Methoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline (Compound 1)** (ref. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4125)



203,2850 g/mol

- 5 Under argon, *m*-anisidine (2.3 mL, 20.3 mmol) and  $\text{InCl}_3$  (232mg, 1.03mmol) in acetone (30 mL) was heated at 50 °C for 14 h. The solvent was removed and the crude partitioned between DCM and aqueous saturated solution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated. Purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc 100:0 -> 99:1) afforded the desired compound as a yellowish solid. The spectroscopic data are in accordance with the literature
- 10 (Tamariz, J. *et al. J. Org. Chem.* 2013, *78*, 9614-9626.). **Yield:** 61% (2.51 g, 12.3 mmol). **Mp** 68.8 °C. **TLC** R<sub>f</sub>: 0.5 (Cyclo/EtOAc 9:1). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.97 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.20 (dd,  $J$  = 8.4, 2.5 Hz, 1H), 6.01 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 5.19 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 1.96 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 3H), 1.26 (s, 6H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup>  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}$  204.1388, found 204.1385.

15 **b. 1-(7-Methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)guanidine (Compound 2)**

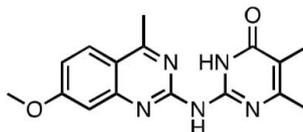


231,2590 g/mol

- 7-methoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline (compound **1**) (2.0 g, 0.98 mmol) and HCl (0.25 mL, 0.98 mmol, 4 M in dioxane) was stirred at room temperature for 30 min. Then  $\text{H}_2\text{O}$  (95 mL) and dicyandiamide (831 mg, 0.98 mmol) was added and the mixture was refluxed for 48 h. After cooling at 60 °C, the oil was filtered and the pH was adjusted to 11 with an aqueous saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$ . The precipitate formed was filtered off and dried *in vacuo*. The compound **2** was isolated as an off-white powder. **Yield:** 78% (1.76 g, 0.76 mmol). **Mp** 235-236 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.95 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H), 7.82 (s, 2H), 7.11 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J$  = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.70 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup>  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}$  232.1198, found 232.1193.

30

c. 2-((7-Methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)amino)-5,6-dimethylpyrimidin-4(3H)-one (Madrasin, Compound 3)

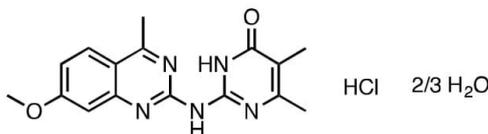


311,3450 g/mol

5 A solution of 1-(7-methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)guanidine (compound 2) (3.2 g, 13.8 mmol), ethyl 2-methyl-3-oxobutanoate (2.3 mL, 16.2 mmol),  $\text{NaHCO}_3$  (1.43 g, 17 mmol) in DMSO (22 mL) was heated at 110 °C for 48 h. After cooling at room temperature cold water was added. The precipitate formed was filtered off and purified by column chromatography (DCM/ MeOH 100:0 -> 10 98:2) to afford the madrasin 3 as a beige powder. **Yield:** 83% (3.58 g, 11.5 mmol). **Mp** 216.4-217.5 °C. **TLC** R<sub>f</sub>: 0.26 (DCM/MeOH 98:2). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.25 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.86 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.07 (dd,  $J = 9.1, 2.5$  Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.06 (s, 3H). **HRMS** (ESI) ( $M + H$ )<sup>+</sup> m/z calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2$  312.1462, found 312.1458.

15

d. Madrasin hydrochloride (Madr.HCl, EYP34)



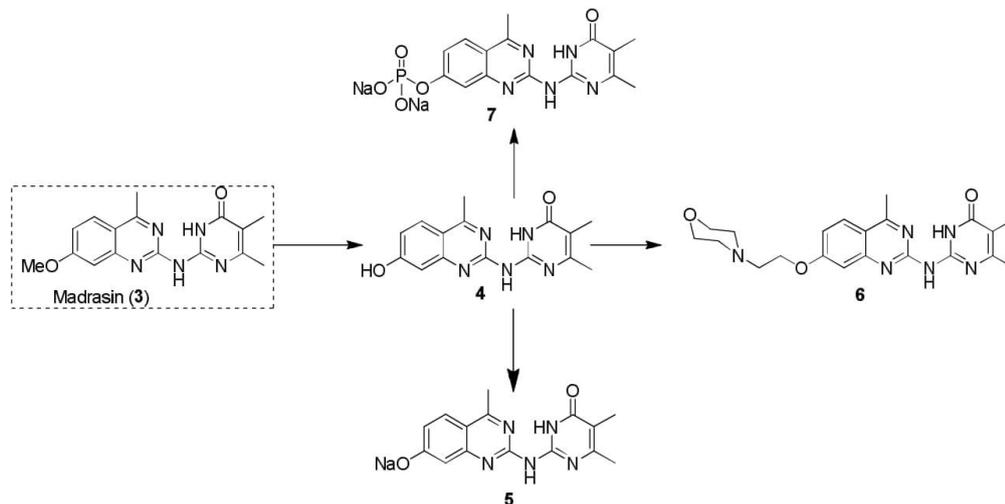
To a solution of madrasin (compound 3) (600 mg, 1.98 mmol) in dry dioxane (10 mL) was added HCl (0.5 mL, 2 mmol, 4 M in dioxane). The mixture was allowed to stir at room temperature for 10 min. 20 The precipitate formed was filtered off and dry *in vacuo* to afford the Madrasin chlorhydrate salt (565 mg, 1.68 mmol, 85%) as a clear green powder. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  7.76 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.74 (s, 3H). **Mp** > 330 °C (decomposition). **HRMS** (ESI) ( $M + H$ )<sup>+</sup> m/z calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2$  312.1462, found 312.1460. **Anal.** Calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_2 \cdot 2/3\text{H}_2\text{O}$ : C, 53.41; H, 5.42. Found: C, 53.40; H, 5.47.

25

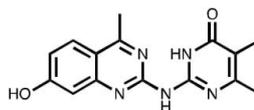
30

## 2) PHARMACOMODULATION OF MADRASIN

## PART 1:



- 5 a. 2-((7-Hydroxy-4-methylquinazolin-2-yl)amino)-5,6-dimethylpyrimidin-4(3H)-one (Compound 4, EYP107)



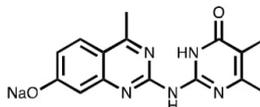
$$C_{15}H_{15}N_5O_2$$

$$297,3180 \text{ g/mol}$$

- 10 Under argon, at  $-78^\circ\text{C}$ , to a solution of Madrasin (compound 3) (250 mg, 0.8 mmol) in DCE (15 mL) was added dropwise  $\text{BBr}_3$  (12 mL, 12 mmol). The solution was allowed to warm to room temperature and heated at  $60^\circ\text{C}$  for 20 h. After quenching, the solvent was removed under reduced pressure. The crude was taken up with EtOAc and washed with an aqueous saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$ . The aqueous layer was extracted 10 times with EtOAc. The combined organic layers were dried over
- 15  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated. The desired compound 4 was precipitate in DCM, filtered and washed several times with DCM. **Yield:** 42% (1.0 g, 0.34 mmol). **Mp**  $348.8\text{--}349.9^\circ\text{C}$ . **TLC** R<sub>f</sub>: 0.18 (DCM/MeOH 97:3).  **$^1\text{H NMR}$**  (300 MHz, DMSO)  $\delta$  13.52 (s, 1H), 10.93 (s, 2H), 8.05 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.03 (dd,  $J = 9.8, 1.1$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 2.77 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 1.90 (s, 3H). **HRMS** (ESI)  $(M + H)^+$   $m/z$  calculated for  $C_{15}H_{16}N_5O_2$  298.1304, found 298.1312.

20

**b. Sodium 2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-4-methyl quinazolin-7-olate (Compound 5, EYP112)**



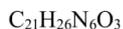
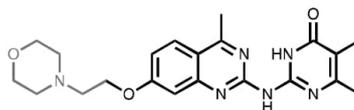
319,2998 g/mol

5

To a suspension of 2-((7-hydroxy-4-methylquinazolin-2-yl)amino)-5,6-dimethylpyrimidin-4(3*H*)-one (compound **4**) (15 mg, 0.05 mmol) in water (1.5 mL) was added NaOH (50  $\mu\text{L}$ , 0.05 mmol, 1 M in  $\text{H}_2\text{O}$ ). The stirring was continued for 5 minutes until a clear solution was obtained. After evaporation to dryness, a yellow solid was obtained. **Yield:** >99% (15 mg, 0.05 mmol).  **$^1\text{H NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.51 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.67 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.71 (s, 3H). **HRMS** (ESI) ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2$  298.1304, found 298.1259.

10

**c. 5,6-Dimethyl-2-((4-methyl-7-(2-morpholinoethoxy)quinazolin-2-yl)amino)pyrimidin-4(3*H*)-one (Compound 6, EYP201)**



410,4780 g/mol

15

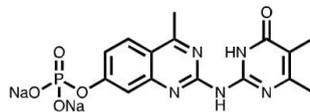
Under an inert atmosphere, compound **4** (35 mg, 0.118 mmol) was suspended in DMF (1 mL) and KOH (13 mg, 0.23 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h until it became clear. Then 2-chloro-*N*-ethylmorpholine (22 mg, 0.12 mmol) was added and the mixture was stirred for 14 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo*. The compound **6** was obtained after column chromatography (DCM/MeOH 100:0  $\rightarrow$  97:3) as a off-white powder. **Yield:** 19% (9.1 mg, 0.022 mmol). **TLC** R<sub>f</sub>: 0.2 (DCM/MeOH 96:4).  **$^1\text{H NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.26 (s, 1H), 7.85 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.08 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 4.29 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 3.76 (t,  $J = 4.7$  Hz, 4H), 2.89 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.62 (t,  $J = 4.6$  Hz, 4H), 2.26 (s, 3H), 2.05 (s, 3H). **HRMS** (ESI) ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_3$  411.2145, found 411.2152.

20

25

30

**d. Sodium 2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-4-methylquinazolin-7-yl phosphate (Compound 7, EYP59)**



5

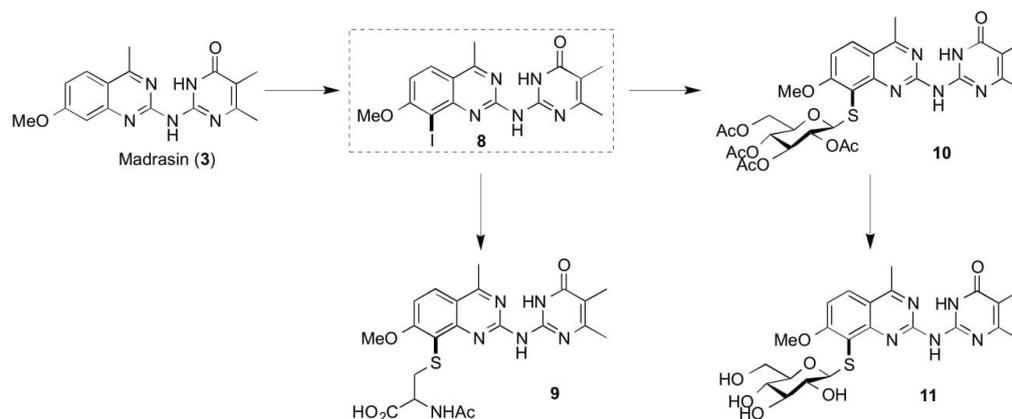
A suspension of compound 4 (100.4 mg, 0.33 mmol) and KOH (25 mg, 0.44 mmol) in H<sub>2</sub>O (5 mL) was stirred at room temperature for 30 min. DCM (5 mL) was then added, followed by (EtO)<sub>2</sub>P(O)Cl (0.064 mL, 0.44 mmol) and TBAB (141 mg, 0.44 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo. The intermediate diethylphosphate derivative was obtained after column chromatography (DCM/MeOH 100:0 → 97:3). **Yield:** 38% (55 mg, 0.12 mmol). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.16 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 4.28 (p, *J* = 7.4 Hz, 4H), 2.84 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.39 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

10

The purified diethylphosphate (55 mg, 0.12 mmol) compound was then solubilized in DCM (2.5 mL); TMSI was added and the reaction was stirred for 3 h at room temperature. The solvent was evaporated and the crude was triturated with DCM, filtered and then was suspended in H<sub>2</sub>O. An aqueous solution of NaOH (0.250 mL, 0.254 mmol) was slowly added and the mixture became limpid after 30 min of stirring. The solvent was removed under vacuum to afford Madrasin-phosphate (compound 7). **Yield:** 93% (50 mg, 0.11 mmol). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.97 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.47 – 7.38 (m, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 1.87 (s, 3H). <sup>31</sup>P NMR (81 MHz, D<sub>2</sub>O) δ -174.17. HRMS (ESI) (*M* + *H*)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>5</sub>P 400.0787, found 400.0792.

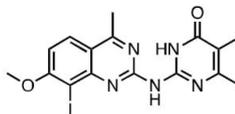
20

**PART 2:**



25

a. 2-((8-Iodo-7-methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)amino)-5,6-dimethylpyrimidin-4(3H)-one  
(Compound 8)



5

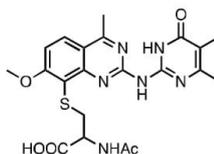
 $C_{16}H_{16}IN_5O_2$ 

437,2415 g/mol

To a cooled solution of Madrasin (compound 3) (360 mg, 1.16 mmol) in  $H_2SO_4$  conc. (1.2 mL) was added (in the dark) NIS (248 mg, 1.10 mmol). The solution was stirred at room temperature for 5 h. The mixture was poured in cold water and the pH was adjusted to 5. After extraction with DCM, the organic layers combined were dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated. Purification by column chromatography (DCM/MeOH 100:0  $\rightarrow$  98:2) afforded the desired compound 8. **Yield:** 25% (127 mg, 0.29 mmol). **TLC** R<sub>f</sub>: 0.22 (DCM/MeOH 98:2).  **$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  13.50 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.96 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.07 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> m/z calculated for  $C_{16}H_{17}N_5O_2$  438.0427, found 438.0427.

15

b. N-Acetyl-S-(2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-7-methoxy-4-methylquinazolin-8-yl)cysteine (Compound 9, EYP102)


 $C_{21}H_{24}N_6O_5S$ 

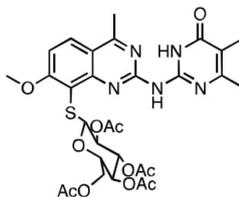
20

472,5200 g/mol

In a sealable vial, under an inert atmosphere, were added 2-((8-iodo-7-methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)amino)-5,6-dimethylpyrimidin-4(3H)-one compound 8 (10.6 mg, 0.025 mmol), cysteineNHAc (7 mg, 0.04 mmol),  $PdG_3Xantphos$  (5 mg, 0.005 mmol) and THF (0.1 mL). The mixture was purged with argon and  $NEt_3$  (10  $\mu$ L, 0.07 mmol) was added. The mixture was stirred at 50  $^{\circ}C$  for 18 h and at 70  $^{\circ}C$  for 6 h. The solvent was removed and purification by column chromatography (DCM/MeOH 100:0  $\rightarrow$  70:30) afforded the desired compound 9. A second purification by preparative TLC was necessary (DCM/MeOH 75:25) to furnish pure compound 9 as a white powder. **Yield:** 48% (5.7 mg, 0.012 mmol). **TLC** R<sub>f</sub>: 0.1 (DCM/MeOH 8:2).  **$^1H$  NMR** (300 MHz, MeOD)  $\delta$  8.11 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.70-3.55 (m, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.70 (sl, 1H), 2.23-1.98 (m, 6H), 1.73 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> m/z calculated for  $C_{21}H_{25}N_6O_5S$  473.1607, found 473.1608.

30

c. ((1*S*,2*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-Acetoxy-7,8-diacetyl-4-((2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-7-methoxy-4-methylquinazolin-8-yl)thio)-3,7λ<sup>3</sup>,8λ<sup>3</sup>-trioxabicyclo[4.2.0]octan-2-yl)methyl acetate (Compound 10, EYP86)



5

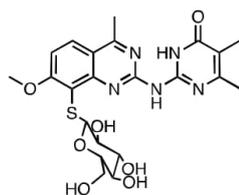
$$\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{S}$$

673,6940 g/mol

Under an inert atmosphere, a solution of 2-((8-iodo-7-methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)amino)-5,6-dimethylpyrimidin-4(3*H*)-one compound **8** (25 mg, 0.055 mmol) and thioglucose (22 mg, 0.06 mmol) in THF (0.5 mL) was purged with argon. The catalyst PdG<sub>3</sub>Xantphos (10 mg, 0.01 mmol) and Et<sub>3</sub>N (20 μL, 0.14 mmol) were added and the reaction mixture were heated at 50 °C for 3 h. The solvent was removed *in vacuo* and purification by column chromatography (DCM/MeOH 100:0 → 97:3) afforded the desired compound **10** as an orange solid. **Yield:** 41%. (15.4 mg, 0.022 mmol). **TLC** R<sub>f</sub>: 0.3 (DCM/MeOH 96:4). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, MeOD) δ 8.18 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.17 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.75 – 4.66 (m, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.99 – 3.89 (m, 1H), 3.62 – 3.52 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.62 (s, 2H), 2.10 (s, 6H), 1.94 (d, *J* = 9.4 Hz, 6H), 1.66 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (*M* + Na)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>NaS 696.1651, found 696.1657.

d. 2-((7-Methoxy-4-methyl-8-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)thio)quinazolin-2-yl)amino)-5,6-dimethylpyrimidin-4(3*H*)-one (Compound 11, EYP113)

20



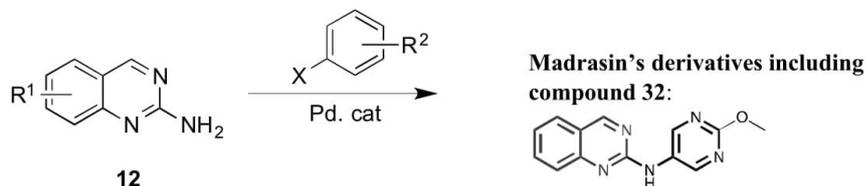
$$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$$

505,5460 g/mol

A solution of compound **10** in MeONa (0.19 mL, 0.038 mmol, 0.2 M in MeOH) was stirred at room temperature for 1h. After evaporation of the solvent *in vacuo*, compound **11** was obtained as a yellow powder. **Yield:** >99% (7 mg, 0.014 mmol). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, MeOD) δ 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.53 – 3.28 (m, 5H), 2.98 – 2.91 (m, 2H), 2.58 (s, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.80 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (*M* + H)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S 506.1709, found 506.1729.

25

## 3) GENERAL PROCEDURE A:



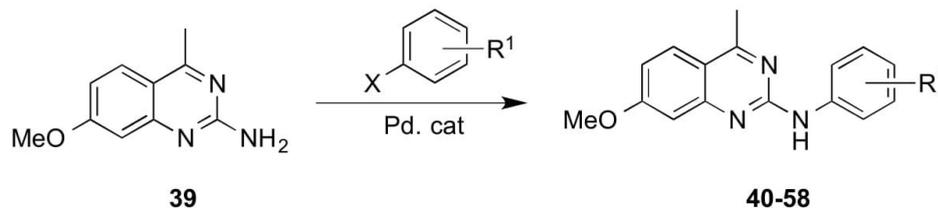
Under an inert atmosphere, were added 2-aminoquinazoline derivative (1 equiv) (compound **12**), aryl halide (1.5 equiv; unless otherwise stated), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (7.5 mol% or 10 mol%), Xantphos (15 mol% or 20 mol%) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 equiv). The mixture was purged with argon. THF was added. The vial was sealed and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 14 h. After cooling at room temperature, the solvent was removed under vacuum and the crude was purified by column chromatography to afford the desired compound.

10

**N-(2-Methoxypyrimidin-5-yl)quinazolin-2-amine (Compound 32, EYP281, C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O, 253,2650 g/mol):** Following the general procedure A, starting from 2-aminoquinazoline (21 mg, 0.13 mmol), 5-bromo-2-methoxypyrimidine (26 mg, 0.19 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (9 mg, 0.01 mmol), Xantphos (12 mg, 0.02 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84 mg, 0.26 mmol), THF (0.65 mL). **Yield:** 42% (13 mg, 0.05 mmol). Beige powder. **Mp** 210.9-211.7 °C. **TLC** R<sub>f</sub>: 0.2 (DCM/MeOH 98:2). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.11 (s, 1H), 9.03 (s, 2H), 7.77 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H), 7.38 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 4.04 (s, 3H).

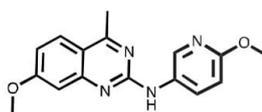
15

## 4) ANOTHER SERIES FROM THE METHODOLOGY PART



20

## a. 7-Methoxy-N-(6-methoxypyridin-3-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (Compound 41, EYP174)

C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

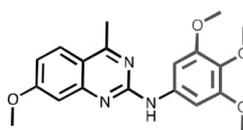
296,3300 g/mol

Following the general procedure A (except that only 1.1 equiv of heteroaryl bromide were used), starting from 2-amino-4-methyl-7-methoxyquinazoline (compound **39**) (25 mg, 0.13 mmol), 2-

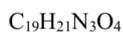
25

methoxy-5-bromopyridine (0.017 mL, 0.14 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12 mg, 0.013 mmol), Xantphos (15 mg, 0.026 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84 mg, 0.26 mmol), THF (0.65 mL). **Yield:** 76% (29 mg, 0.10 mmol). Orange powder. **Mp** 172.1-173.0 °C. **TLC Rf:** 0.6 (DCM/MeOH 98:2). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.59 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.89 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 2.72 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 297.1352, found 297.1328.

**b. 7-Methoxy-4-methyl-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl)quinazolin-2-amine (Compound 42, EYP188)**



10

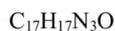
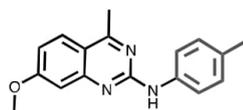


355,3940 g/mol

Following the general procedure A, starting from 2-amino-4-methyl-7-methoxyquinazoline (compound **39**) (25 mg, 0.13 mmol), 1-bromo-3,4,5-trimethoxybenzene (47 mg, 0.19 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12 mg, 0.013 mmol), Xantphos (15 mg, 0.026 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84 mg, 0.26 mmol), THF (0.65 mL). **Yield:** 58% (26 mg, 0.07 mmol). Pale yellow powder; **Mp** 159.5-160.1 °C. **TLC Rf:** 0.8 (DCM/MeOH 98:2). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.11 (s, 2H), 6.97 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.92 (dt, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 6H), 3.83 (s, 3H), 2.75 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 356.1610, found 356.1546.

20

**c. 7-Methoxy-4-methyl-N-(*p*-tolyl)quinazolin-2-amine (Compound 43, EYP156)**

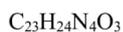
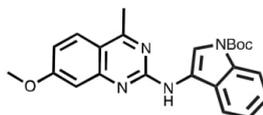


279,3430 g/mol

Following the general procedure A, starting from 2-amino-4-methyl-7-methoxyquinazoline (compound **39**) (25 mg, 0.13 mmol), 4-bromotoluene (32 mg, 0.19 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12 mg, 0.013 mmol), Xantphos (15 mg, 0.026 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84 mg, 0.26 mmol), THF (0.65 mL). **Yield:** 39% (14.0 mg, 0.05 mmol). Off-white solid. **Mp** 142.8-143.3 °C. **TLC Rf:** 0.7 (DCM 100%). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.24 – 7.12 (m, 3H), 7.05 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.75 (s, 3H), 2.34 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O 280.1450, found 280.1444.

30

d. *t*-Butyl 3-((7-methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)amino)-1*H*-indole-1-carboxylate (Compound 46, EYP177)

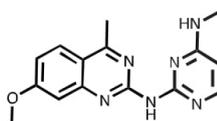


404,4700 g/mol

5

Following the general procedure A (except that only 1.1 equiv of heteroaryl bromide were used), starting from 2-amino-4-methyl-7-methoxyquinazoline (compound **39**) (25 mg, 0.13 mmol), 3-bromoindole derivative (41 mg, 0.14 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12 mg, 0.013 mmol), Xantphos (15 mg, 0.026 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84 mg, 0.26 mmol), THF (0.65 mL). **Yield:** 31% (16 mg, 0.04 mmol). Orange powder. **Mp** 114-116 °C. **TLC** R<sub>f</sub>: 0.55 (DCM/MeOH 98:2). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.57 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.40 – 7.27 (m, 4H), 7.09 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 1.73 (s, 9H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 405.1927, found 405.1932.

15 e. *N*<sup>2</sup>-(7-Methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)-*N*<sup>4</sup>-methylpyrimidine-2,4-diamine (Compound 49, EYP181)

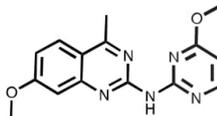


296,3340 g/mol

20 Following the general procedure A (except that only 1.1 equiv of heteroaryl chloride were used), starting from 2-amino-4-methyl-7-methoxyquinazoline (compound **39**) (25 mg, 0.13 mmol), 2-chloro-*N*-methylpyrimidin-4-amine (20 mg, 0.14 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12 mg, 0.013 mmol), Xantphos (15 mg, 0.026 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84 mg, 0.26 mmol), THF (0.65 mL). **Yield:** 31% (11 mg, 0.04 mmol). Grey powder. **Mp** 247.4-249.1 °C. **TLC** R<sub>f</sub>: 0.45 (DCM/MeOH 9:1). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, MeOD) δ 8.02 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.07 (s, 3H), 2.85 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>6</sub>O 297.1464, found 297.1473.

30

f. **7-Methoxy-*N*-(4-methoxypyrimidin-2-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (Compound 50, EYP179)**

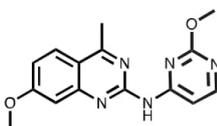


297,3180 g/mol

5

Following the general procedure A (except that only 1.1 equiv of heteroaryl chloride were used), starting from 2-amino-4-methyl-7-methoxyquinazoline (compound **39**) (25 mg, 0.13 mmol), 2-chloro-4-methoxypyrimidine (20 mg, 0.14 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12 mg, 0.013 mmol), Xantphos (15 mg, 0.026 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84 mg, 0.26 mmol), THF (0.65 mL). **Yield:** 62% (23 mg, 0.08 mmol). Yellow powder. **Mp** 160.8-161.5 °C. **TLC R<sub>f</sub>:** 0.3 (DCM/MeOH 98:2). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.42 – 8.33 (m, 1H), 8.28 – 8.16 (m, 1H), 7.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.01 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 2.81 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> m/z calculated for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> 298.1304, found 298.1302.

15 g. **7-Methoxy-*N*-(2-methoxypyrimidin-4-yl)-4-methylquinazolin-2-amine (Compound 54, EYP190)**

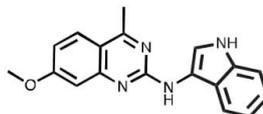


297,3180 g/mol

20 To a solution of compound **53 (EYP193)** (10 mg, 0.033 mmol) in MeOH (0.5 mL) was added NaOMe (0.15 mL, 0.075 mmol). The mixture was heated at 80 °C for 6 h. The solvent was then removed in vacuo and purification by column chromatography (DCM/MeOH 100:0 → 99:1) afforded the desired compound **54** as a white solid. **Yield:** 61% (6 mg, 0.02 mmol). **Mp** 173.9-174.3 °C. **TLC R<sub>f</sub>:** 0.27 (DCM/MeOH 98:2). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.41 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 2.81 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> m/z calculated for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> 298.1304, found 298.1309.

30

**h. N-(1*H*-Indol-3-yl)-7-methoxy-4-methylquinazolin-2-amine (Compound 57, EYP165)**



C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O

304,3530 g/mol

- 5 To a solution of compound **46 (EYP177)** (35 mg, 0.08 mmol) in DCM (2 mL) was added TFA (0.1 mL, 1.3 mmol). The solution was stirred at room temperature for 2 h. After addition of an aqueous saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and extraction with DCM, the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to dryness. Purification by column chromatography (DCM/MeOH 100:1 -> 200:1) afforded the desired compound **57** as a white solid. **Yield:** 48% (11 mg, 0.04 mmol). White powder. **TLC R<sub>f</sub>:** 0.6 (DCM/MeOH 98:2). **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.69 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.73 (s, 3H). **HRMS** (ESI) (M + H)<sup>+</sup> *m/z* calculated for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O 305.1402, found 305.1408.

**15 T-cell assay**

- MCA205 and B16F10 mouse cell lines are transfected with the plasmid YFP-Globin-SL8-intron or with the PCDNA3 empty plasmid (negative control) with the transfection reagent jetPRIME (Ozyme) or GeneJuice (Millipore) respectively according to each manufacturer protocol. Twenty-four hours after transfection, cells are treated with different doses of Madrasin (Sigma SML 1409), Madra.HCl (3.HCl) or the different compounds herein cited. Cells are then washed three times with PBS 1X and 5.10<sup>4</sup> tumor cells are co-cultured with 1.10<sup>5</sup> B3Z hybridoma in a 96-well plate. In positive control wells, 4μg/ml of synthetic peptide SL8 is added. Cells are then incubated overnight at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The plate is centrifuged at 1200rpm for 5min, cells are washed twice with PBS 1X and lysed for 5min at 4°C under shaking in 0.2% TritonX-100, 0.2% DTT, 0.5M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The lysate is centrifuged at 3000rpm for 10min and the supernatant is transferred to a 96-well optiplate (OptiPlaque-96, PerkinElmer). A revelation buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 11,2 mM β-mercaptoethanol, 0,0015% IGEPAL® CA-630 and 40 μM 4-Methylumbelliferyl β-D-Galactopyranoside (MUG) in PBS is added and the plate is incubated at room temperature for 3 hours. Finally, the β-galactosidase activity is measured using the FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH GmbH, 30 Offenburg, Germany). Results are expressed as mean ± SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (unpaired student t test).

**Tumor challenge and treatment**

- C57Bl/6J female mice are obtained from Harlan Laboratories Ltd, Switzerland. 7 week-old mice are injected subcutaneously into the right flank with 1.10<sup>5</sup> MCA205 sarcoma or B16F10 melanoma cells

or  $1.5 \cdot 10^5$  MCA205 globin-SL8-intron or B16F10 globin-SL8-intron cells. Sarcoma cells are injected in 100  $\mu$ L sterile PBS while melanoma cells are injected in 50:50 PBS:Matrigel to prevent tumor cell dissemination. Madra.HCl is injected 4, 7, 10 and 14 days post tumor inoculation, in 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O+30% (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin (w/v). In the same manner EYP59 (compound 7) is injected 4, 7, 10 and 14 days post tumor inoculation, in 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Area of the tumor is recorded every 3 to 4 days until the tumor reaches the ethical end points. All animal experiments were carried out in compliance with French and European laws and regulations. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (ANOVA with Tukey's multiple comparison test comparing all groups).

10

## RESULTS

### **Madrasin treatment increases antigenic presentation of PTP-derived antigens in cancer cells.**

In recent studies inventors have shown that PTPs is a major source of peptides for the endogenous MHC class I pathway *in vitro*. In order to modulate the presentation PTPs-derived antigens at cancer cells surface, inventors tested the impact of Madrasin treatment on mice tumor cell lines, one melanoma (B16F10) and one sarcoma (MCA205) cell lines. Both murine cell lines were transiently expressing the PTPs-SL8 epitope derived from an intron within the  $\beta$ -Globin gene construct or were kept untransfected. The Madrasin elicits an increase in the PTPs-dependent antigen presentation, with a dose dependent effect in both mouse cell lines (Figure 1A). These results show that production and presentation of PTPs-derived antigens can be positively modulated in cancer cell lines upon Madrasin treatment. They support the hypothesis that this molecule could be used as positive immunomodulator to potentiate a specific anti-tumoral immune response dependent on the PTPs production and presentation.

### **Synthesized Madrasin Hydrochloride (Madra.HCl) treatment increases antigenic presentation of PTP-derived antigen *in vitro* and slow down tumor growth *in vivo*.**

The above results demonstrate that the Madrasin is able to increase the production and presentation *in vitro* of PTPs-dependent antigen encoded by intron sequences at the cell surface of treated tumor cell lines. The next question was to see if the Madrasin, which can be only dissolved in DMSO, can have the same effect on tumor growth and CD8<sup>+</sup> T cell proliferation *in vivo*. Unfortunately, inventors were not able to perform an *in vivo* experiment with Madrasin because of its week concentration in DMSO. As this first result was encouraging, they decided to generate derivatives of the Madrasin in order to increase cancer immune responses. In fact, Madrasin is insoluble in water and can only be dissolved in DMSO solvent rendering its pharmacokinetic in mice less efficient.

In order to make Madrasin available for broader *in vitro* and *in vivo* validation without the use of toxic carriers or cosolvents (DMSO), it was considered necessary to find a strategy to synthesize Madrasin and some derivatives to enhance their solubility and immunomodulator activities.

To this end phosphate prodrugs for example can typically display excellent water solubility, chemical stability, and rapid bioconversion back to the parent drug by phosphatases. The formation of phosphate prodrugs has been applied to increase the aqueous solubility of a variety of molecules, including antineoplastic phenolic natural products and their derivatives, exemplified by combretastatin A-4.

In view to test the new compounds as positive immunomodulator against tumor cell lines, inventors first decided to test them in an *in vitro* assay. As expected, the new compound, herein identified as “Madra.HCl” was able to be dissolved in water. After treatment of both murine cell lines MCA205 or B16F10 transiently expressing PTPs-SL8 epitope derived from an intron in the  $\beta$ -Globin gene (Globin-intron-SL8) with 5 $\mu$ M or 10 $\mu$ M of Madra.HCl, inventors observed an increase in PTPs-dependent antigen presentation in a dose dependent manner (Figure 1B). 1.10<sup>5</sup> MCA205 sarcoma cells stably expressing the SIINFEKL (SL8) epitope from an intron in the  $\beta$ -Globin gene (Globin-intron-SL8) were subcutaneously inoculated in mouse. Four days after this inoculation, the mice were intraperitoneally vaccinated with a defined dose of Madra.HCl. Then every 3 days 20 or 40mg/kg of Madra.HCl were injected. During that time the tumor growth was monitored every two to three days (Figure 1C). Inventors observed a significant 50% reduction of tumor growth at day 27 after challenge in mice treated with 20 mg/kg of Madra.HCl (Figure 1D) and a further 60 to 70% decrease of tumor growth at day 27 after challenge in mice treated with 40 mg/kg of Madra.HCl (Figure 1D). The same experiment is performed on B16F10 tumor cells expressing the Globin-intron-SL8 construct.

In the same manner, 1.10<sup>5</sup> untransfected MCA sarcoma cells were subcutaneously inoculated in mouse. Four days after this inoculation, the mice were intraperitoneally vaccinated with a defined dose of Madra.HCl. Then, every 3 days the same doses were again injected. During that time the tumor growth was monitored every two to three days (Figure 1E). Inventors observed a significant 40% reduction of tumor growth at day 21 after challenge in mice treated with 20 mg/kg or 40 mg/kg of Madra.HCl (Figure 1F).

Furthermore, Madra.HCl treatment was shown to extend survival of mice, with around 25% of survivors 120 days after tumor inoculation when mice were treated with 40 mg/kg of Madra.HCl and with around 15% of survivors 120 days after tumor inoculation when mice were treated with 20 mg/kg of Madra.HCl (Figure 1G).

Finally, mice which were inoculated with MCA205 tumor cells expressing the Globin-intron-SL8 construct, and that experienced complete tumor regression after treatment with Madra.HCl as described above were re-challenged 100 days later with MCA205 tumor cells expressing the Globin-intron-SL8 construct on the right flank and with B16F10 tumor cells on the left flank. While B16F10 tumors grew over time, the MCA205 tumor cells did not grow in mice (Figure 1H). These results demonstrate that mice developed a long term anti-tumoral response specific to MCA205 tumor after Madra.HCl treatment.

**Madrasin derivatives efficiently increase MHC class I presentation of intron-derived antigen *in vitro*.**

In order to improve the immunomodulatory activity of the Madra.HCl for broader *in vitro* and *in vivo* validation without the use of toxic carriers or cosolvents (DMSO), it was considered necessary to find a strategy to change its structure by steal keeping its activity. The next compounds of the present invention were prepared as herein above described.

In order to test the new compounds as positive immunomodulators against tumor cell lines, inventors first decided to test them in an *in vitro* assay. As expected, few derivatives of Madra.HCl were soluble in water and some other not. Using an MTT test, they identified the IC25 and the IC50 for each compounds in MCA sarcoma and B16F10 melanoma cell lines (Figure 2). For the rest of the experiments, they decided to treat both cell lines with the IC50 of each compound soluble or not in water. For that purpose, both murine tumor cell lines, transiently expressing PTPs-SL8 epitope derived from an intron in the  $\beta$ -Globin gene (Globin-intron-SL8), were treated O/N with each compounds. Four different observations for the immunomodulatory activity of each compound were made:

The first was that, they noticed an increase in PTPs-dependent antigen presentation with some of the compounds in both murine tumor cell lines (Figure 3). They could see an increase of the PTP-SL8 presentation after treatment of the murine cell lines with EYP59 (compound **7**) (A), EYP201 (compound **6**) (B), EYP165 (compound **57**) (C) and EYP281 (compound **32**) (D) respectively.

The second observation was that some compounds were able to positively increase presentation of their PTPs-derived antigen in only MCA cell lines transiently expressing PTPs-SL8 epitope derived from an intron in the  $\beta$ -Globin gene (Figure 4). They could see an increase of the PTP-SL8 presentation after treatment of the murine sarcoma cell lines with EYP188 (compound **42**) (A) and EYP86 (compound **10**) (B) respectively.

Furthermore, the third observation was that some compounds were able to positively increase presentation of our PTPs-derived antigen in only B16F10 cell lines transiently expressing PTPs-SL8 epitope derived from an intron in the  $\beta$ -Globin gene (Figure 5). Inventors could see an increase of the PTP-SL8 presentation after treatment of the murine melanoma cell lines with EYP174 (compound **41**) (A), EYP179 (compound **50**) (B), EYP190 (compound **54**) (C) and EYP181 (compound **49**) (D) respectively.

And finally, the fourth observation was that some compounds were not able to positively increase the presentation of our PTPs-derived antigen in both murine cell lines tested (Figure 6). Inventors could not see any increase of the PTP-SL8 presentation after treatment of both murine cell lines with EYP177 (compound **46**) (A), EYP156 (compound **43**) (B), EYP113 (compound **11**) (C), and EYP102 (compound **9**) (D) respectively.

35

**Madrasin derivative EYP59 (compound 7) efficiently reduces tumor growth *in vivo* in an immune-dependent manner.**

1.10<sup>5</sup> MCA205 sarcoma cells stably expressing the SIINFEKL (SL8) epitope from an intron in the  $\beta$ -Globin gene (Globin-intron-SL8) were subcutaneously inoculated in mouse. Four days after this inoculation, the mice were intraperitoneally vaccinated with a define dose of EYP59. Then, every 3 days, 20 mg/kg were injected. During that time the tumor growth was monitored every two to three days (Figure 7A). Inventors observed a significant 85% reduction of tumor growth at day 23 after challenge in mice treated with 20 mg/kg of EYP59 (Figure 7B). In the same manner, 1.10<sup>5</sup> untransfected MCA205 sarcoma cells were subcutaneously inoculated in mouse. Four days after this inoculation, the mice were intraperitoneally vaccinated with a define dose of EYP59. Then, every 3 days the same doses were again injected. During that time, the tumor growth was monitored every two to three days. Inventors observed a significant 70% reduction of tumor growth at day 19 after challenge in mice treated with 20 mg/kg of EYP59 (Figure 7C).

In order to assess the requirement of the immune response for this effect, inventors tested the impact of 20mg/kg EYP59 treatment in immunodeficient nu/nu mice with the same settings as previously described and observed that it has no effect on the tumor growth. These results show that tumor size reduction upon EYP59 treatment requires the presence of an active immune response *in vivo*.

**DISCUSSION**

The present invention reveals that specific spliceosome inhibitors have a positive effect on the antitumor immune response and therefore on tumor growth. Splicing abnormalities have emerged as a specific feature of cancer and are studied as predictive markers for patient survival as well as targets for cancer treatments with splicing inhibitors, some of which are currently in development in acute myeloid leukemia. In the present invention inventors demonstrate that some specific derivatives of Madrasin are potent stimulators of the anti-tumor immune response *in vitro* in sarcoma and melanoma tumor cell lines. They also demonstrate that some Madrasin derivatives are specifically increasing the PTP-dependent antigen presentation in sarcoma cancer model and that some others, different from the first set, are also capable to increase the PTP-dependent antigen presentation un melanoma cancer model. They open the way to new applications within the framework of targeted molecular therapies by highlighting original biomolecular profiles.

The PTPs model describes the pre-spliced mRNA as the template for PTP by an alternative translational event occurring in the nucleus. In the study describing this alternative translation, inventors demonstrated that forced nuclear retention of the mRNA encoding the intronic SL8 peptide leads to an increase in the SL8 antigen presentation. Besides, pladienolides and spliceostatin A (SSA) have been shown to inhibit the splicing by targeting the SF3b, a subcomplex of the U2 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in the spliceosome, and have been described to promote pre-RNA accumulation in the nucleus. The Madrasin inhibits differently the splicing by preventing stable

U4/U6/U5 tri-snRNPs recruitment right after the U2 snRNP fixation. However, it is likely that it also induces pre-mRNA accumulation in the nucleus, resulting in the increase in antigen presentation. The link between pre-mRNA nuclear accumulation and increased antigen presentation is not known. It is tempting to hypothesize that pre-mRNA accumulation in the nucleus provides more templates for PTP production leading to the enrichment of SL8-containing PTPs, used as a major source for SL8 direct presentation.

Furthermore, pre-mRNA splicing is an essential mechanism required for the normal function of all mammalian cells. In the last few years, several studies reported the presence of mutations and overexpression of main spliceosome factors associated with aberrant splicing activity in various cancers. Few years ago, inventors have also provided some evidence that the inhibition of the spliceosome increases MHC class I PTPs-dependent antigen presentation. These findings put the focus on the spliceosome as a potential target in anti-cancer treatment.

As already mentioned, few small molecules have already been reported to inhibit the spliceosome and specifically to inhibit the spliceosome factor SF3B1 function. Although the precise mechanisms of these small molecules are not yet completely understood, it has been reported that they can be effective in cancer therapy by reducing tumor size from 40 to 80% depending of the compound used. The only one to date that has been tested in human is the E7107. It has been stopped because of problems of toxicity. This compound is known to inhibit the spliceosome by interacting with SF3B1.

Moreover, Cytotoxic T lymphocytes failure to reject tumors can in part be explained by an initial inappropriate CTL activation by pAPCs. A defined subset of dendritic cells (DCs) has been described in the tumor microenvironment (TME) to be able to migrate to the tumor draining lymph nodes, deliver intact antigens encountered in the TME and prime directly or not naïve CD8<sup>+</sup> T cells. In addition, it was suggested that some DCs are able to directly prime naïve CD8 T cells in the TME. Inventors recently demonstrated that tumor-associated PTPs are a source material for CD8<sup>+</sup> T cells cross-priming by DCs and may mainly be transferred from tumor cells to DCs by PTPs-carrying exosomes. Besides, they provided hints that PTPs for endogenous and cross-presentation are produced by the same translation event and that the two pathways then diverge quickly. PTPs are rare products and the efficiency of PTPs vaccines or exosome-containing PTPs vaccines was shown to rely on the previous PTPs enrichment of PTPs proteasome inhibitor. Inventors believe that the splicing inhibitor Madrasin and its different derivatives, in addition to provide more source materials for the direct antigen presentation, enriches the pool of SL8-containing PTPs that serve as a source material for intratumoral DC uptake and cross-presentation, inducing an enhanced SL8-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation.

In the present description, inventors provide both *in vitro* and *in vivo* evidences that by modulating the spliceosome activity using specific derivative compounds from Madrasin, it is possible to induce a specific anti-tumor immune response against different cancer models. Madrasin has been reported to interfere in the early step of assembly of the spliceosome. In fact, it has been demonstrated that

Madrasin inhibits the A complex of the pre-spliceosome to form a larger pre-catalytic spliceosome B complex. We demonstrated that by inhibiting the formation of the spliceosome, as early as possible using derivatives of the Madrasin *in vitro* and *in vivo*, the anti-tumor antigenic presentation was increased significantly, by inducing specifically CD8<sup>+</sup> T cell proliferations against PTPs-dependent epitopes. They report that these derivatives can be used as chemotherapeutic agents against melanoma and sarcoma.

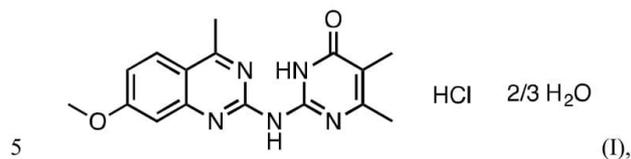
## REFERENCES

- Apcher, S. *et al.* Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11572–7 (2011).
- 5 - Burg, S. H. *et al.* Vaccines for established cancer : overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat. Publ. Gr.* **16**, 219–233 (2016).
- Caron, E. *et al.* The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol Syst Biol.* **7**, 533 (2011).
- Duvallet, E., *et al.* Exosome-driven transfer of tumor-associated Pioneer Translation Products ( TA-PTPs ) for the MHC class I cross-presentation pathway. *Oncoimmunology* **5**, e1198865 (2016).
- 10 - Kmiecik, M.,*et al.* HER-2/neu antigen loss and relapse of mammary carcinoma are actively induced by T cell-mediated anti-tumor immune responses. *Eur. J. Immunol.* **37**, 675–685 (2007).
- Lee, S. & Sin, J. MC32 tumor cells acquire Ag-specific CTL resistance through the loss of CEA in a colon cancer model. *Hum Vaccin Immunother* **11**, 2012–2020 (2015).
- 15 - Leone, P. *et al.* MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1172–87 (2013).
- Liu, Y. *et al.* Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 789–801 (2012).
- Mellman, I.,*et al.* Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–489 (2014).
- 20 - Watson, N. F. S. *et al.* Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int. J. Cancer* **118**, 6–10 (2006).
- Yewdell, JW., *et al.* Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* **157**(5):1823-6 (1996).

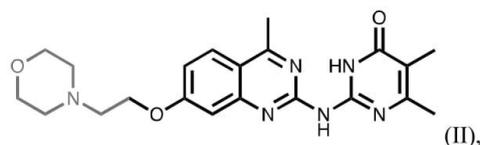
25

## CLAIMS

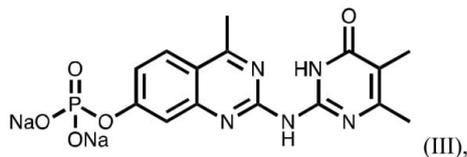
1. A compound selected from  
Madrasin hydrochloride



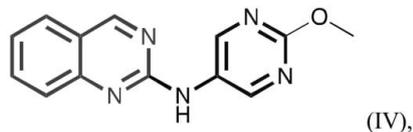
5,6-Dimethyl-2-((4-methyl-7-(2-morpholinoethoxy)quinazolin-2-yl)amino)pyrimidin-4(3H)-one



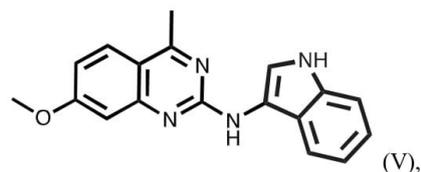
Sodium 2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-4-methylquinazolin-7-yl phosphate



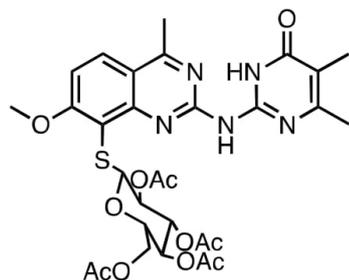
10 N-(2-Methoxypyrimidin-5-yl)quinazolin-2-amine



N-(1H-Indol-3-yl)-7-methoxy-4-methylquinazolin-2-amine

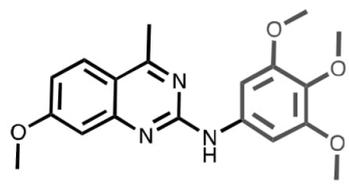


15 ((1S,2S,4R,5S,6S)-5-Acetoxy-7,8-diacetyl-4-((2-((4,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)amino)-7-methoxy-4-methylquinazolin-8-yl)thio)-3,7λ3,8λ3-trioxabicyclo[4.2.0]octan-2-yl)methyl acetate



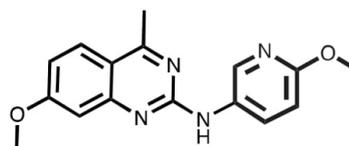
(VI),

7-Methoxy-4-methyl-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl)quinazolin-2-amine



(VII),

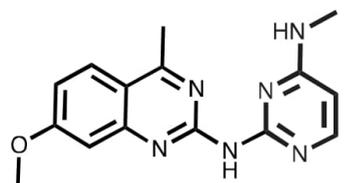
7-Methoxy-N-(6-methoxypyridin-3-yl)-4-methylquinazolin-2-amine



5

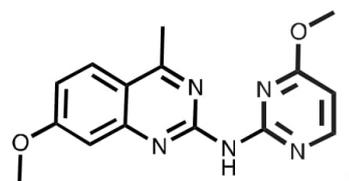
(VIII),

N2-(7-Methoxy-4-methylquinazolin-2-yl)-N4-methylpyrimidine-2,4-diamine



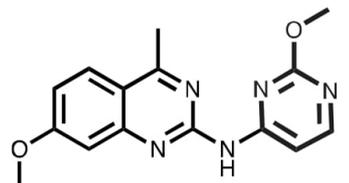
(IX),

7-Methoxy-N-(4-methoxypyrimidin-2-yl)-4-methylquinazolin-2-amine



(X), and

10 7-Methoxy-N-(2-methoxypyrimidin-4-yl)-4-methylquinazolin-2-amine



(XI)

, for use as a medicament.

2. The compound according to claim 1 for use in the treatment of cancer, for use in the prevention of cancer metastasis and/or for use in the prevention of cancer recurrence in a subject.
- 5 3. The compound for use according to claim 2 in combination with at least one distinct anticancer agent and/or with radiotherapy.
4. The compound for use according to claim 2 or 3, wherein cancer is selected from a carcinoma, sarcoma, lymphoma, germ cell tumor, blastoma, leukemia and multiple myeloma.
- 10 5. The compound for use according to claim 4, wherein the compound is selected from the compound of formula II, III, IV, V, VI and VII, and the cancer is a sarcoma.
6. The compound for use according to claim 4, wherein the compound is selected from the compound  
15 of formula II, III, IV, V, VIII, IX, X and XI, and the carcinoma is a melanoma.
7. The compound for use according to anyone of claims 3 to 6, wherein the at least one distinct anticancer agent is selected from a chemotherapeutic agent, an immune checkpoint blocker and an anti-cancer vaccine.
- 20 8. The compound according to claim 1, for use for stimulating an anti-cancer immune response in a subject in need thereof.
9. A composition comprising a compound as described in claim 1 and a pharmaceutically acceptable  
25 carrier, preferably together with at least one distinct anticancer agent to be used simultaneously, separately or sequentially.
10. The composition according to claim 9 for use in the treatment of cancer, in the prevention of cancer metastasis and/or in the prevention of cancer recurrence in a subject.
- 30 11. Use of a compound as described in claim 1 for inducing or increasing the presentation, typically the production and presentation, of Pioneer Translation Products (PTPs)-derived antigens by cancer cells, or changing the immunopeptidome, in a subject.
- 35 12. The compound for use according to anyone of claims 2 to 8, the composition according to claim 8 or 9, wherein the subject is a mammal, preferably a human being.

13. A kit comprising a compound as described in claim 1 and at least one distinct anticancer agent in distinct containers.

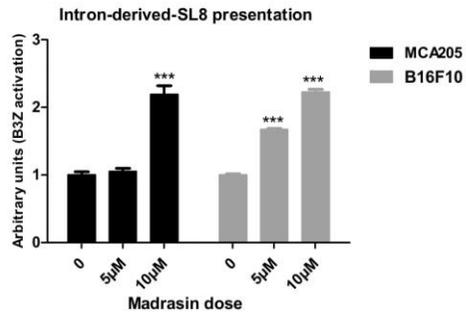
5 14. Use of a kit according to claim 13 to prepare a composition according to anyone of claims 9, 10 or 12.

**ABSTRACT**

5 The present invention relates to the fields of medicine and in particular cancer treatment. The invention more specifically relates to new compounds which are typically for use as a medicament. In particular, the invention relates to the use of these new compounds for increasing the presentation, typically the production and presentation, of Pioneer Translation Products (PTPs)-derived antigens by cells, in particular cancer cells, or changing the immunopeptidome, in a subject, and inducing or stimulating an immune response in the subject. The present disclosure also relates to uses of such  
10 compounds, in particular to prepare a pharmaceutical composition and/or to allow or improve the efficiency of a therapy in a subject in need thereof.

The invention also discloses methods for treating a disease, in particular cancer, for preventing or treating cancer metastasis and/or cancer recurrence, in a subject. The present invention in addition provides kits suitable for preparing a composition according to the present invention and/or for  
15 implementing the herein described methods.

A



B

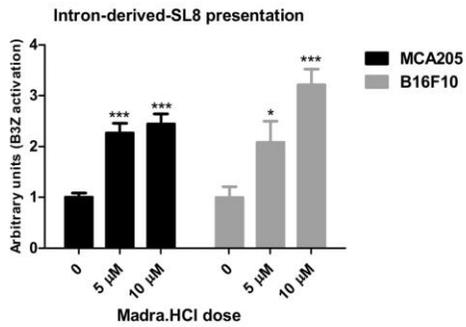


FIGURE 1

C

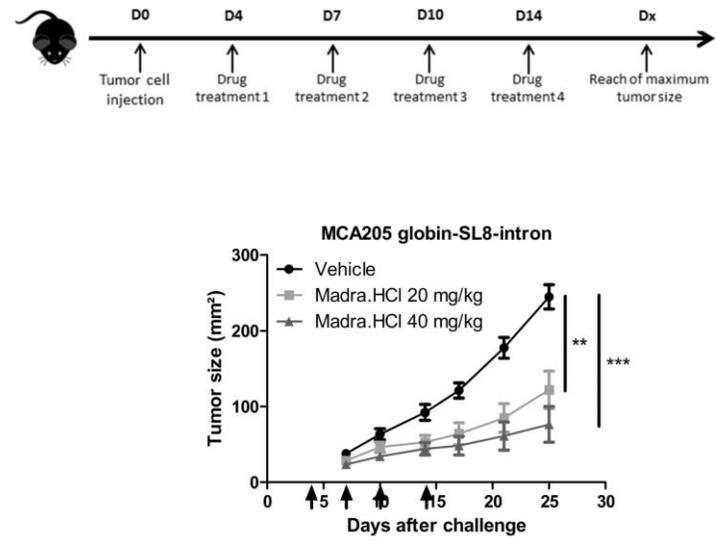
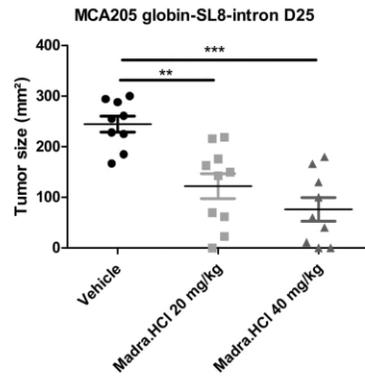


FIGURE 1 (Following)

3/19

D



E

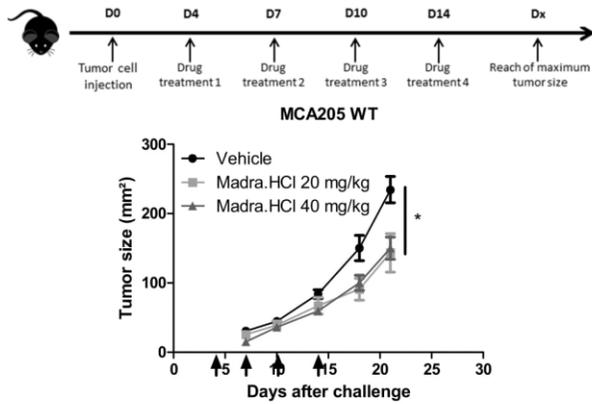
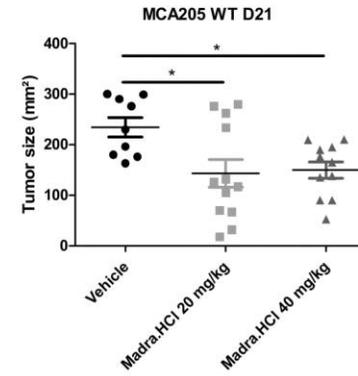


FIGURE 1 (Following)

4/19

F



G

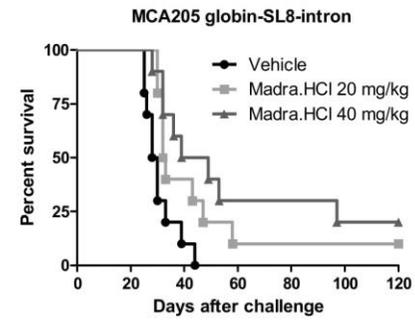


FIGURE 1 (Following)

5/19

H

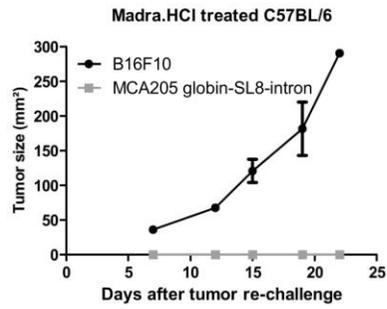


FIGURE 1 (Following)

6/19

A

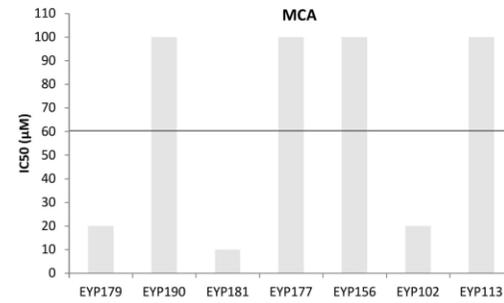
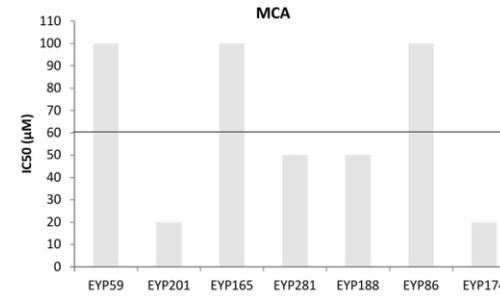


FIGURE 2

7/19

B

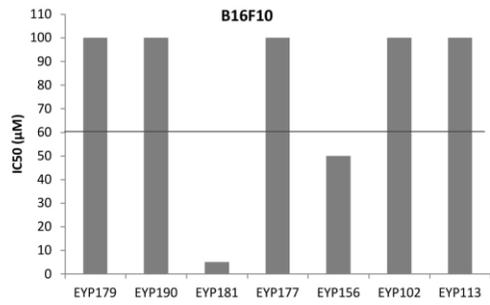
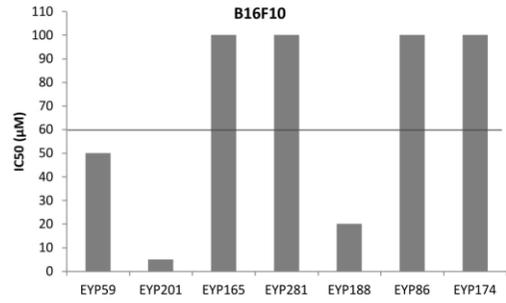
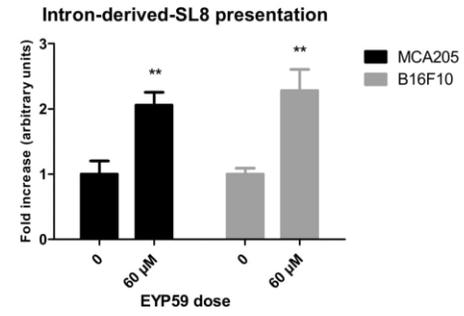


FIGURE 2 (Following)

8/19

A



B

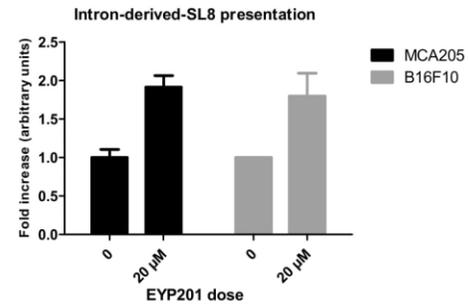
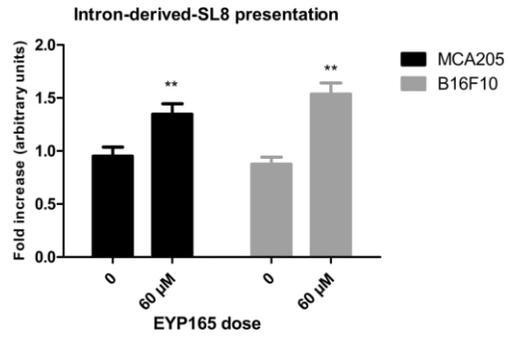


FIGURE 3

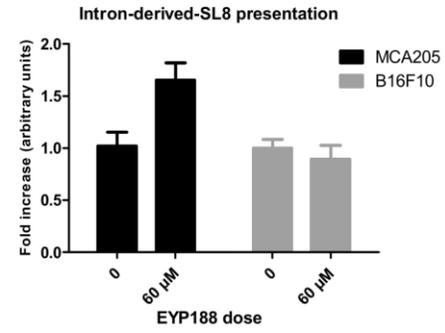
9/19

C

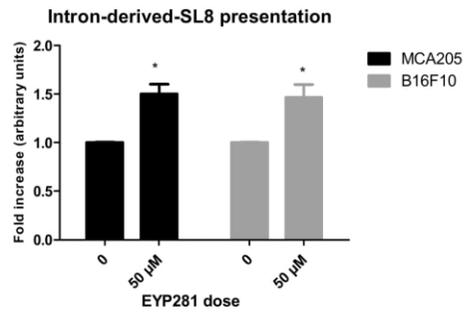


10/19

A



D



B

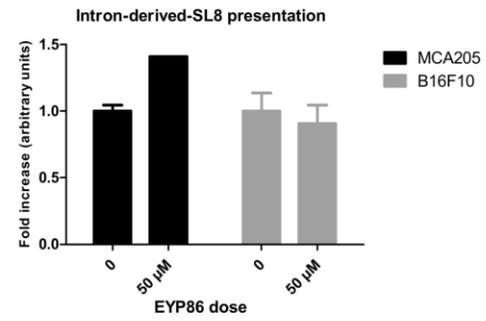
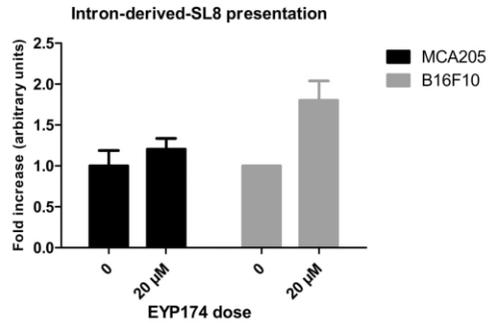


FIGURE 3 (Following)

FIGURE 4

11/19

A



B

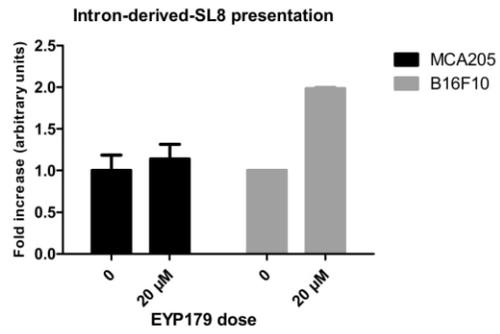
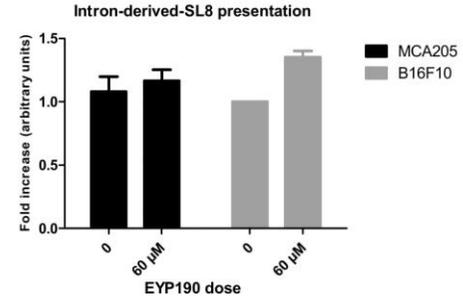


FIGURE 5

12/19

C



D

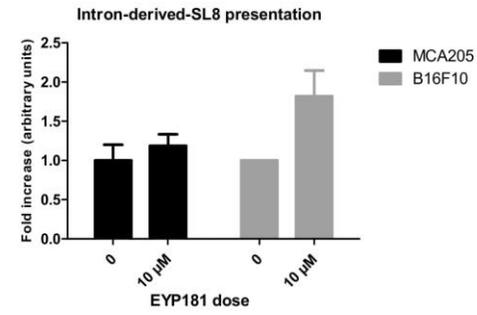
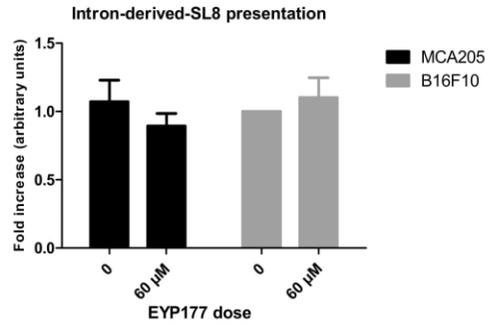


FIGURE 5 (Following)

13/19

A



B

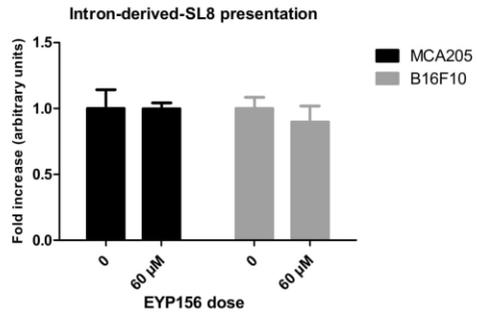
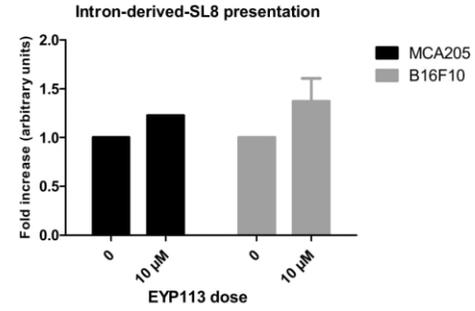


FIGURE 6

14/19

C



D

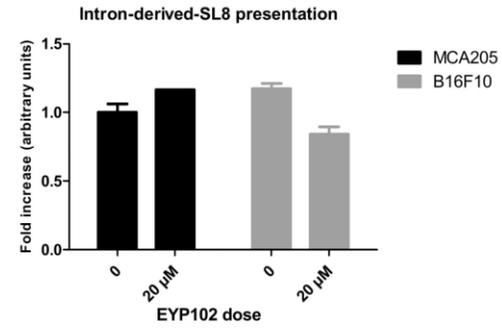


FIGURE 6 (Following)

15/19

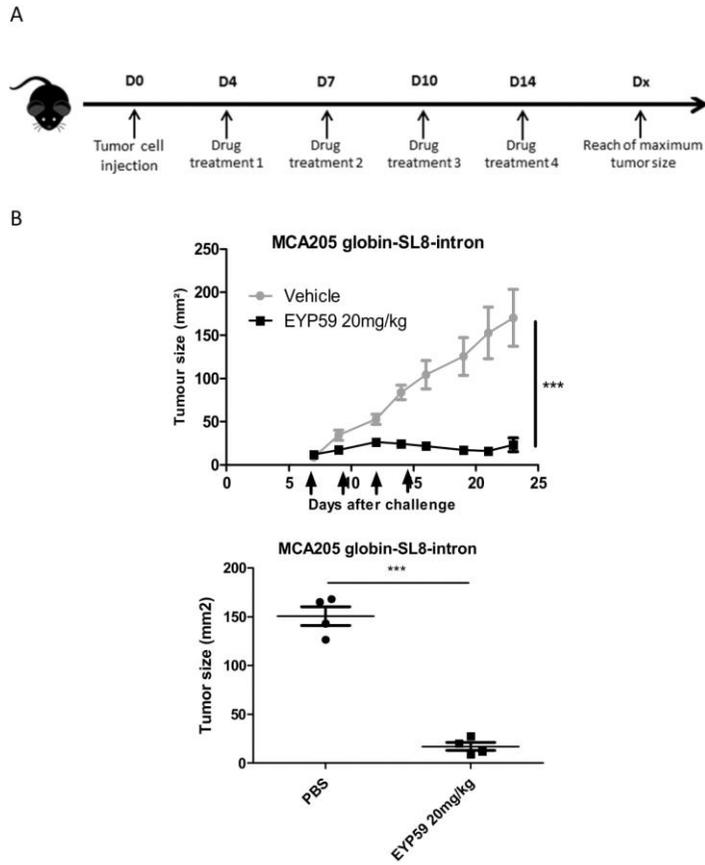


FIGURE 7

16/19

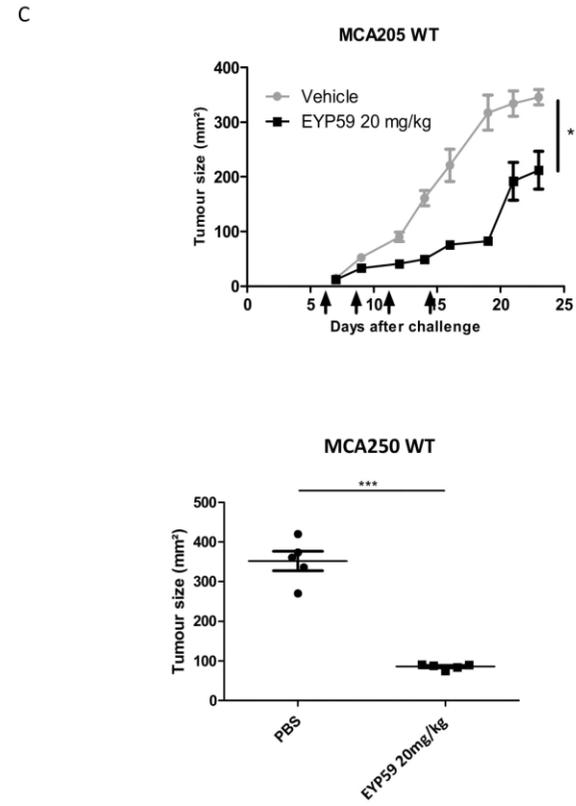


FIGURE 7 (Following)

17/19

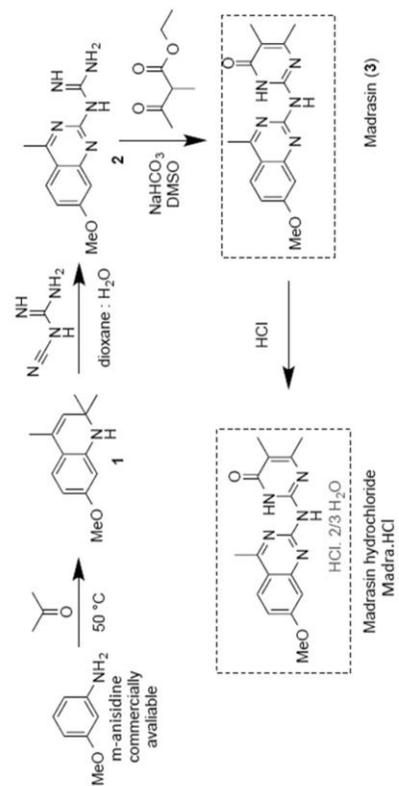


FIGURE 8

18/19

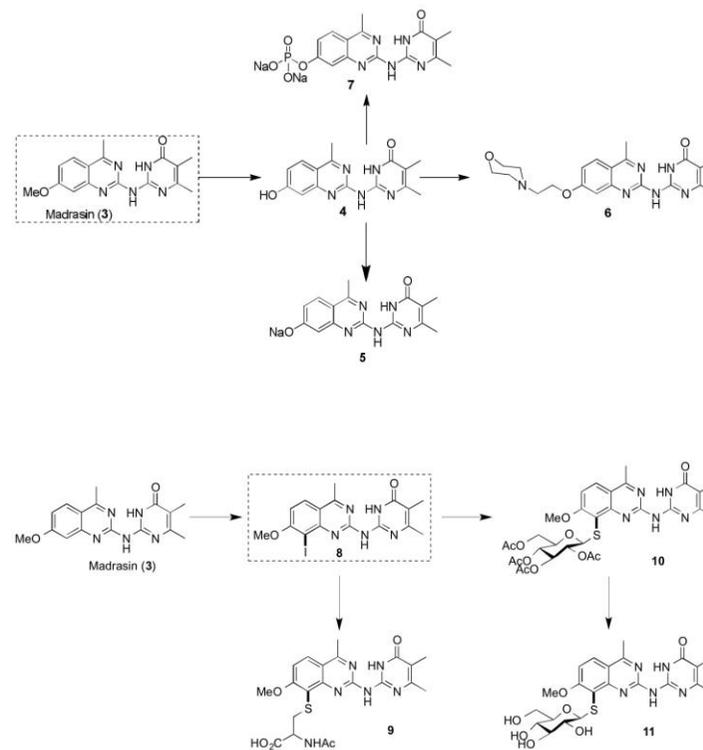


FIGURE 9

19/19

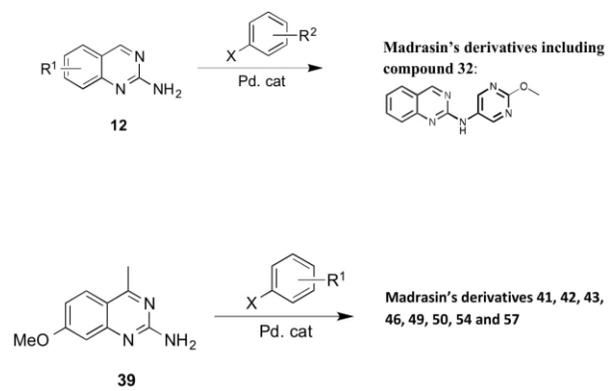


FIGURE 9 (Following)

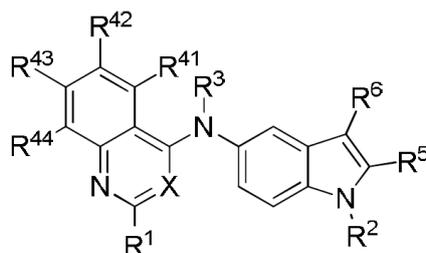
### **III – Agents antitumoraux multi-cibles : antivasculaires aux propriétés immunomodulatrices.**

#### **1. Contexte**

Nos travaux ont permis de mettre en évidence les propriétés immunomodulatrices de deux familles de molécules, l'isoginkgetine et ses dérivés ainsi que la madrasine et ses dérivés, qui partagent une activité commune d'inhibition du spliceosome. Ces molécules ont une activité antitumorale médiée par le système immunitaire et nous avons montré que le composé IP2 pouvait être inclus dans une stratégie de vaccination peptidique permettant de prolonger la survie globale. Néanmoins, nous n'avons pu observer de régression complète de la tumeur qu'avec le modèle de MCA205 globin-SL8-intron qui exprime l'épitope SL8 très immunogène. Dès lors, nous avons cherché à optimiser l'utilisation de ces composés et améliorer leur efficacité. Nous avons discuté dans la partie introductive de cette thèse de l'intérêt des thérapies combinées ou des traitements multi-cibles pour contrer les mécanismes de résistance et d'échappement en partie liés à la grande hétérogénéité des tumeurs (voir 3.4 Affaiblir la tumeur). Nous avons décidé d'adopter cette approche de découverte de médicaments multi-cibles (MTDD) et nous sommes intéressés à un agent anti-vasculaire connu et déjà étudié dans les laboratoires de l'équipe CoSMIT : la combretastatine A-4 (CA-4) (Seddigi et al., 2017).

#### **2. Brevet : Composés à activité inhibitrice de la polymérisation de la tubuline et aux propriétés immunomodulatrices (WO/2019/207257).**

J'ai évalué les propriétés immunomodulatrices d'une série de dérivés de l'isoCA-4 et montré que ces composés augmentaient la présentation antigénique du SIINFEKL dérivé d'une séquence intronique dans les cellules MCA205 et B16F10 *in vitro* (résultats non présentés). La **Figure 48** montre la structure générale de ces composés qui font l'objet du brevet WO/2019/207257 pour leur activité duale antivasculaire via l'inhibition de la polymérisation de la tubuline et immunomodulatrice via l'augmentation de la présentation antigénique.



- X représente un groupe -CH- ou un atome d'azote,
- R<sup>1</sup> représente un atome d'hydrogène, un atome d'halogène, de préférence un atome de chlore, un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, de préférence un groupe méthyle, un groupe -CN ou un groupe -CF<sub>3</sub>, - R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, un groupe aryle-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, de préférence un benzyle, ou un groupe -COR<sup>21</sup> avec R<sup>21</sup> représentant un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle ou un groupe aryle,
- R<sup>3</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, de préférence un groupe méthyle, un groupe aryle-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle ou un groupe -COR<sup>31</sup> avec R<sup>31</sup> représentant un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle ou un groupe aryle,
- R<sup>41</sup>, R<sup>42</sup>, R<sup>43</sup> et R<sup>44</sup> représentent indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène ; un atome d'halogène ; -OR<sup>45</sup> ; -SR<sup>45</sup> ; -NR<sup>45</sup>R<sup>46</sup> ; -NO<sub>2</sub> ; ou un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi un atome d'halogène, -OR<sup>45</sup>, -SR<sup>45</sup>, -NR<sup>45</sup>R<sup>46</sup> et -NO<sub>2</sub>, avec R<sup>45</sup> et R<sup>46</sup> représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, un groupe -CF<sub>3</sub> ou un groupe -COR<sup>47</sup> avec R<sup>47</sup> représentant un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle ou un groupe aryle,
- R<sup>5</sup> et R<sup>6</sup> représentent un atome d'hydrogène ou forment ensemble une chaîne -CR<sup>51</sup>=CR<sup>52</sup>-CR<sup>53</sup>=CR<sup>54</sup>- avec R<sup>51</sup>, R<sup>52</sup>, R<sup>53</sup> et R<sup>54</sup> représentant indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène ; un atome d'halogène ; -OR<sup>55</sup> ; -SR<sup>55</sup> ; -NR<sup>55</sup>R<sup>56</sup> ; -NO<sub>2</sub> ; ou un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi un atome d'halogène, -OR<sup>55</sup>, -SR<sup>55</sup>, -NR<sup>55</sup>R<sup>56</sup> et -NO<sub>2</sub>, avec R<sup>55</sup> et R<sup>56</sup> représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, un groupe -CF<sub>3</sub> ou un groupe -COR<sup>57</sup> avec R<sup>57</sup> représentant un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle ou un groupe aryle.

**Figure 48: Structure protégée des composés à activité duale.**

Le brevet WO/2019/207257 dans son intégralité n'est pas partagé dans ce manuscrit.

### 3. Activité antitumorale des composés multi-cibles

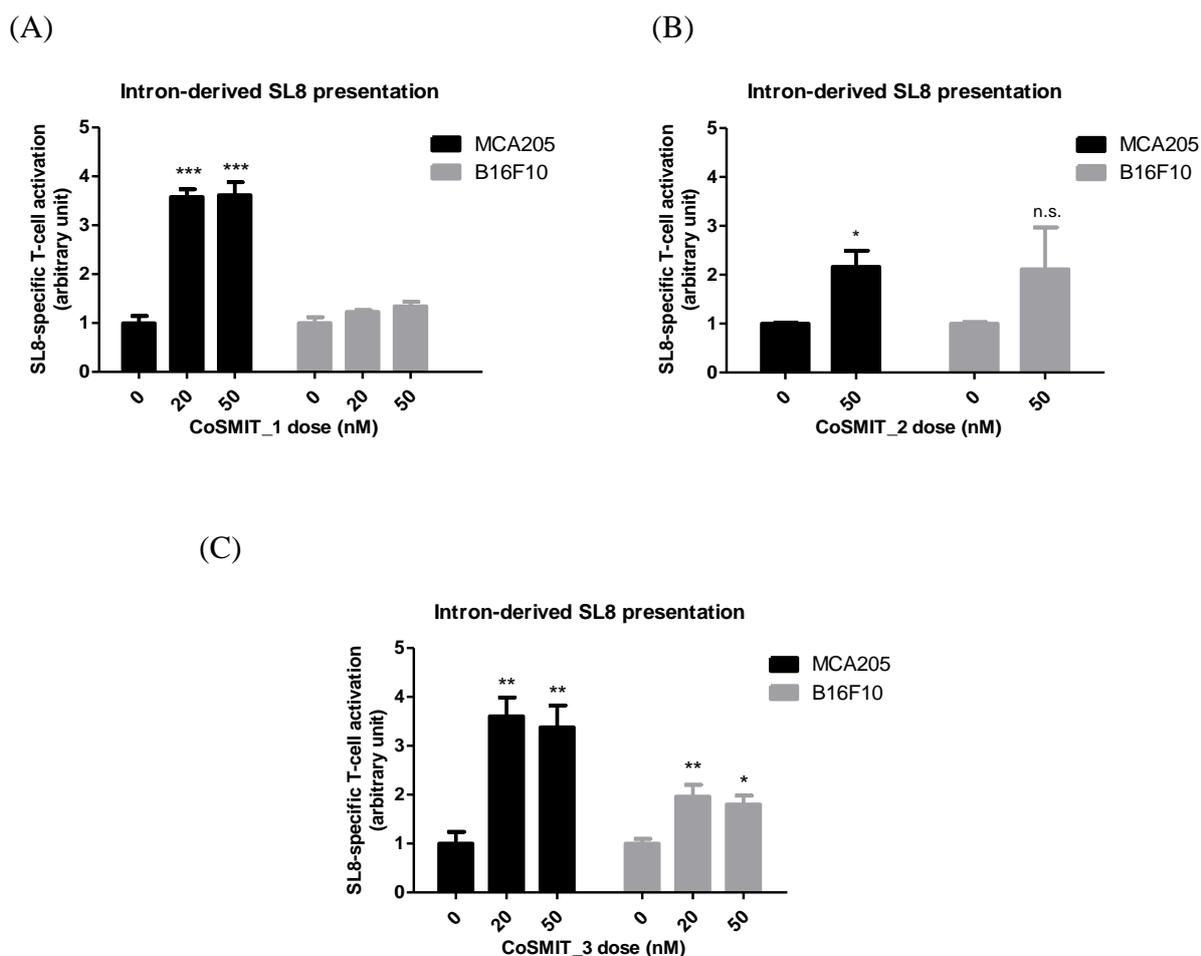
À la suite du dépôt de ce brevet, nous avons poursuivi notre exploration de l'espace chimique de ces composés multi-cibles aux propriétés antivasculaires et immunomodulatrices. La structure des molécules présentées dans la suite de ce manuscrit ne pourra pas être dévoilée car ces-dernières ne sont pas encore protégées par un brevet.

Nous nous intéressons donc à trois composés, CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3 qui

appartiennent au même espace chimique. L'activité antiproliférative de ces composés a été testée sur de nombreuses lignées cellulaires tumorales d'origine humaine et a révélé une forte cytotoxicité avec une concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) de l'ordre de la dizaine de nanomolaire (résultats non présentés). Par ailleurs, l'activité antivasculaire de ces composés a été révélée *in vitro* par des tests d'inhibition de la polymérisation de la tubuline et *in vivo* par imagerie par résonance magnétique (IRM) sur un modèle de xénogreffe de tumeurs humaines sur souris nude (résultats non présentés).

Dans le cadre de notre étude, nous avons évalué l'effet des composés CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3 sur la présentation antigénique du SIINFEKL dérivé d'une séquence intronique dans les cellules MCA205 et B16F10. Les cellules MCA205 globin-SL8-intron et B16F10 globin-SL8-intron ont été traitées avec les composés à 20 nM et 50 nM pendant 18h. Les cellules cancéreuses ont ensuite été mises en contact avec des hybridomes T CD8<sup>+</sup> B3Z spécifiques de l'épitope SL8 pendant 18h. On mesure ensuite l'activité des hybridomes B3Z qui est proportionnelle à la présentation antigénique dans les cellules tumorales (voir II – Test de présentation antigénique *in vitro*).

Nous avons observé que les trois composés augmentent la présentation antigénique du SIINFEKL dérivé d'un intron dans les cellules MCA205 (**Figure 49**). En revanche, seul CoSMIT\_3 a le même effet sur la présentation antigénique dans les cellules B16F10.



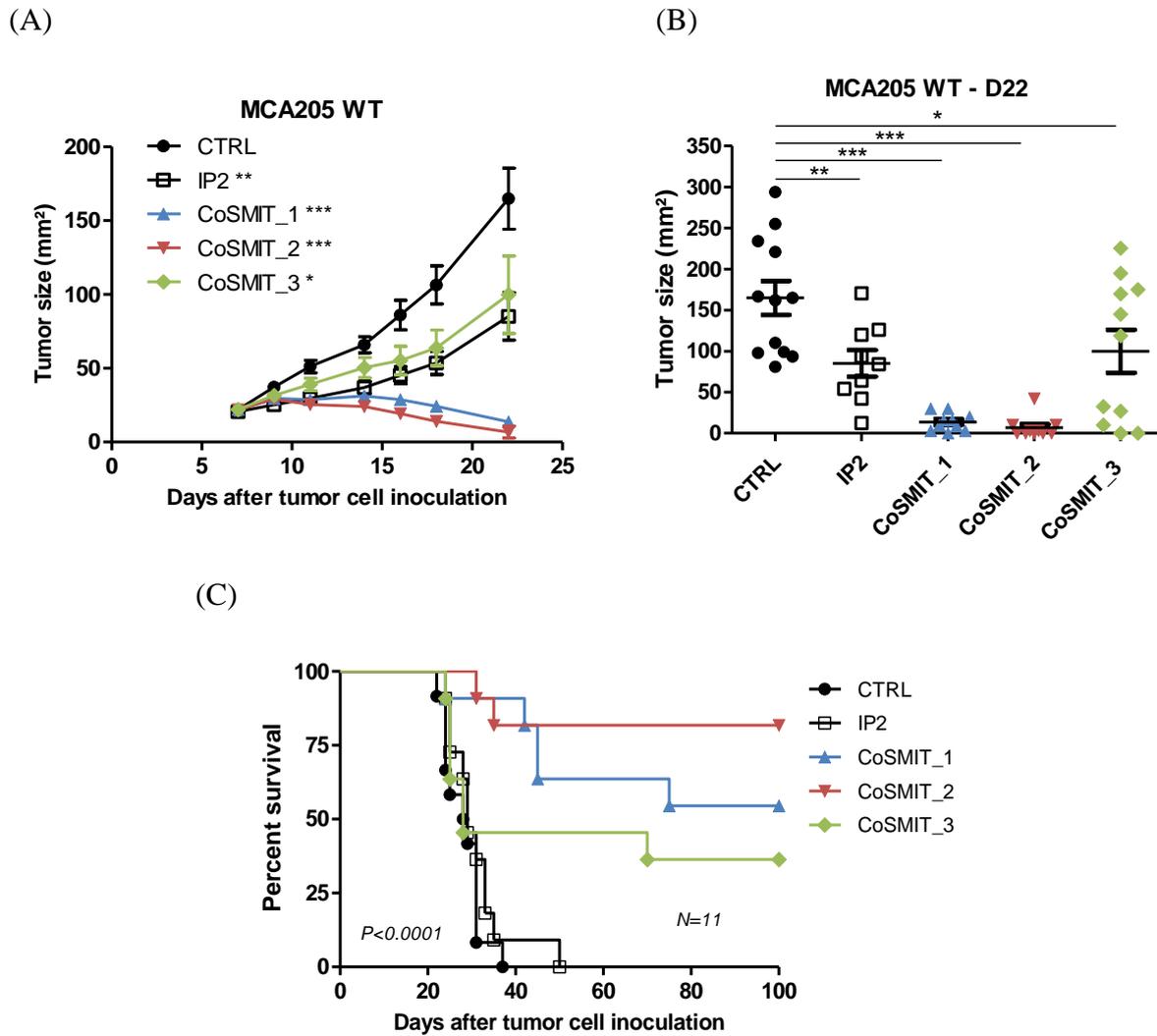
**Figure 49: Effet des composés CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3 sur la présentation antigénique.**

- (A) Augmentation relative de l'activité des B3Z spécifiques du SL8 après traitement avec CoSMIT\_1.  
 (B) Augmentation relative de l'activité des B3Z spécifiques du SL8 après traitement avec CoSMIT\_2.  
 (C) Augmentation relative de l'activité des B3Z spécifiques du SL8 après traitement avec CoSMIT\_3.

Nous avons ensuite cherché à savoir si les propriétés multiples des composés observées *in vitro* se traduisaient par une activité antitumorale *in vivo*. La structure chimique de ces composés leur confère une très faible solubilité dans l'eau. Nous n'avons pas ici travaillé sur des prodrogues hydrosolubles de ces composés mais avons réalisé des tests de solubilité pour déterminer la meilleure formulation du solvant compatible avec des tests *in vivo*. En définitive, les composés sont resuspendus dans une solution extemporanée polyéthylène glycol (PEG) : éthanol (EtOH) : eau (H<sub>2</sub>O) dans les proportions 60 :10 :30. L'activité antitumorale des trois composés est comparée avec celle du composé IP2 lui-même resuspendu dans la solution PEG : EtOH : H<sub>2</sub>O précédemment décrite.

Des cellules MCA205 WT ont été inoculées en s.c. à des souris C57Bl/6 immunocompétentes et les traitements ont débuté une fois les tumeurs établies (25 mm<sup>2</sup>). Les composés sont alors injectés en intra-tumoral à 5 mg/kg à raison de trois injections par semaine pendant deux semaines.

Nous avons observé que les composés CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3 inhibent la croissance tumorale des MCA205 WT et conduisent à des régressions complètes de la tumeur (**Figure 50A**). En effet, près de 80% des souris traitées avec CoSMIT\_2 (9/11) et 55% des souris traitées avec CoSMIT\_1 (6/11) sont sans tumeur plus de deux mois après la fin du traitement (**Figure 50C**). Chez les souris traitées avec CoSMIT\_3, on distingue clairement un groupe de souris qui répond au traitement et qui connaît une régression complète de la tumeur et un groupe de souris qui ne répond pas au traitement (**Figure 50B**). En définitive, près de 35% des souris traitées avec CoSMIT\_3 sont sans tumeur plus de deux mois après la fin du traitement (4/11). Par ailleurs, nous notons une nécrose apparente de la tumeur à partir de la troisième injection des composés CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3 (J11). Cette nécrose de la tumeur n'est pas observée avec le composé IP2 et témoigne des propriétés antivasculaires des trois composés.



**Figure 50: Activité antitumorale du composé IP2 et des composé multi-cibles.**

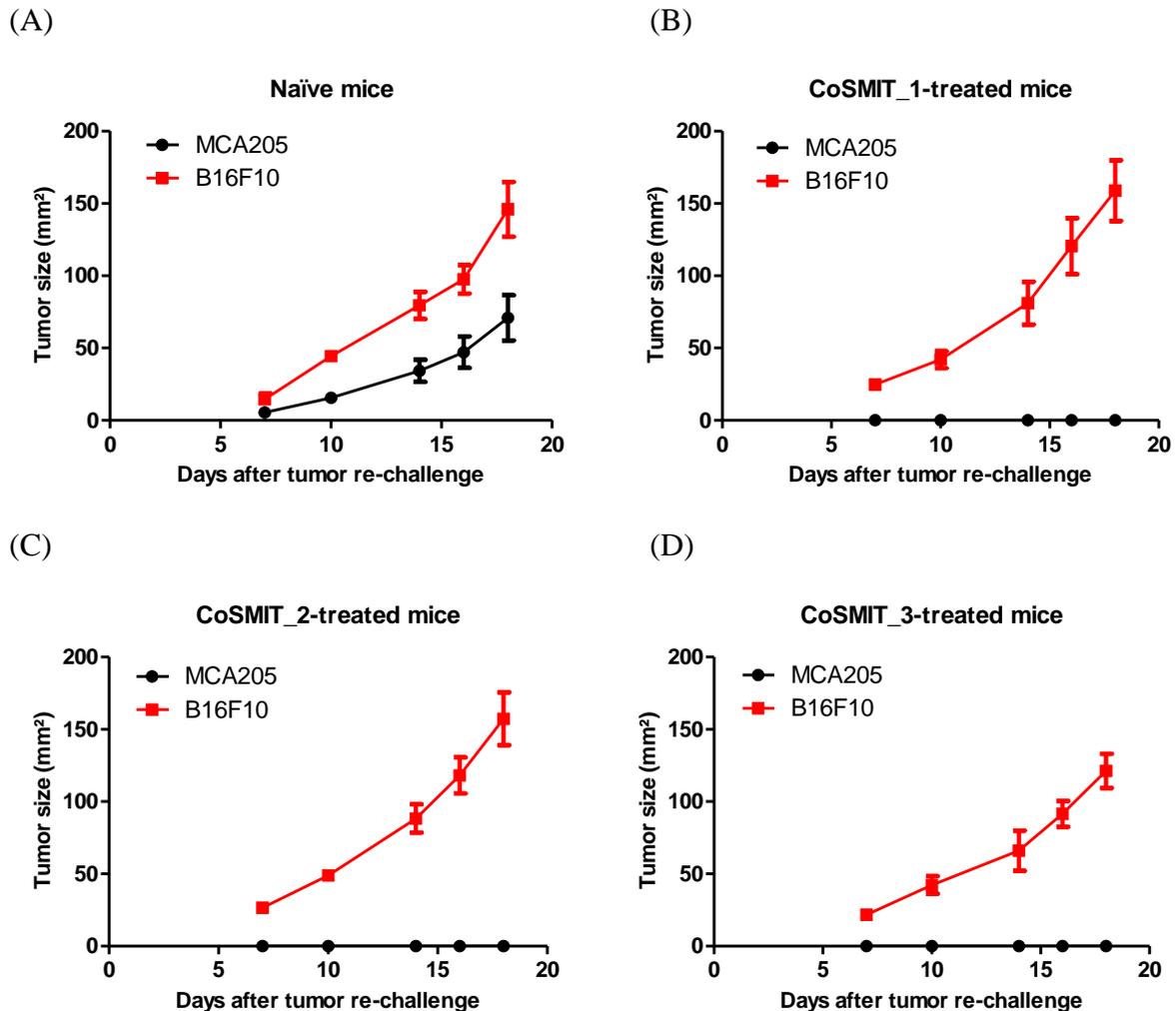
(A) Courbes de croissance tumorale des MCA205 WT.

(B) Taille des tumeurs MCA205 exprimées en aire (mm<sup>2</sup>)   J22

(C) Courbe d'estimation de Kaplan Meier de la survie globale après traitements.

Nous nous sommes finalement demandé si les souris qui avaient connu une régression complète de leur tumeur après traitement avec CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 ou CoSMIT\_3 bénéficiaient d'une protection à long terme. C'est pourquoi, cent jours après inoculation des MCA205 WT en s.c. (soit environ 2,5 mois après la fin des traitements), nous avons procédé à une seconde injection de MCA205 WT dans le flanc droit des souris et à une injection de B16F10 WT dans le flanc gauche. Des souris naïves ont été utilisées en contrôle pour s'assurer de la bonne croissance des cellules tumorales injectées. Nous avons suivi la croissance des deux modèles tumoraux sans procéder à de nouveaux traitements.

Nous avons observé que la croissance tumorale des MCA205 WT est complètement inhibée chez les souris qui ont connu au préalable une régression complète d'une tumeur MCA205 WT après traitement avec CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 ou CoSMIT\_3 (**Figure 51**). En revanche, la croissance tumorale des B16F10 WT n'est pas contrôlée. Cette expérience suggère que les souris traitées avec les composés multi-cibles bénéficient d'une protection au long terme contre le modèle tumoral qu'elles ont combattu.



**Figure 51: Protection à long terme des souris traitées avec les composés multi-cibles.**

(A) Croissance tumorale des MCA205 WT et des B16F10 WT dans les souris naïves.

(B) Croissance tumorale des MCA205 WT et des B16F10 WT dans les souris sans tumeur après traitement avec CoSMIT\_1.

(C) Croissance tumorale des MCA205 WT et des B16F10 WT dans les souris sans tumeur après traitement avec CoSMIT\_2.

(D) Croissance tumorale des MCA205 WT et des B16F10 WT dans les souris sans tumeur après traitement avec CoSMIT\_3.

Nous montrons donc ici que les composés multi-cibles CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 ou CoSMIT\_3 ont une activité antitumorale *in vivo* qui repose sur des propriétés antivasculaires et sur l'induction d'une réponse mémoire spécifique.

## Discussion

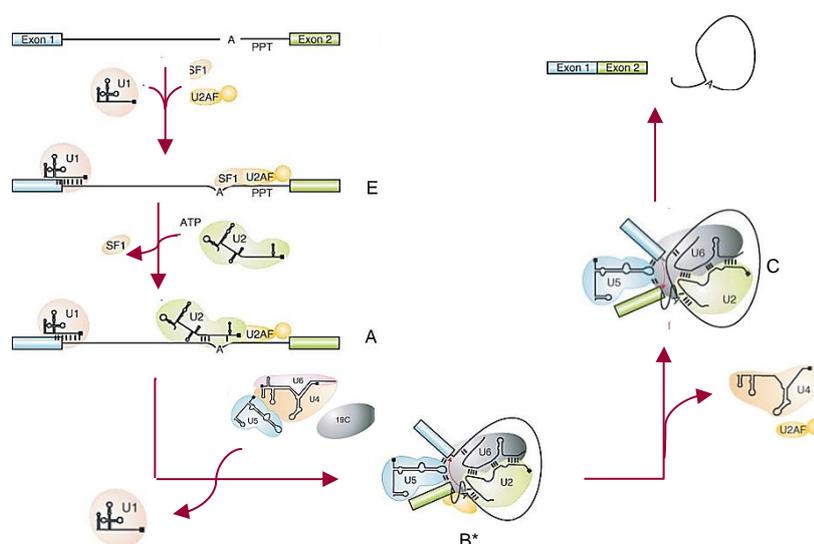
---

La vaccination thérapeutique contre le cancer est une immunothérapie qui vise à induire une réponse cellulaire spécifique et durable dirigée contre les antigènes présentés par la cellule tumorale. Les résultats décevants obtenus jusqu'ici en clinique incitent à orienter les recherches vers l'optimisation du choix des antigènes ciblés par le vaccin et du vecteur utilisé pour l'acheminement de l'antigène ainsi que vers l'élimination de l'environnement immunosuppresseur (Hollingsworth and Jansen, 2019). Dans ce contexte, S. Apcher *et al.* s'intéressent aux sources de peptides antigéniques pour la voie de présentation antigénique par le CMH-I (pCMH-I). Les travaux de l'équipe ont mis en évidence le rôle des *Pioneer Translation Products* (PTPs) dans la production de pCMH-I et la réponse immunitaire antitumorale (Apcher et al., 2011; Duvall et al., 2016). Ces recherches s'inscrivent dans l'exploration plus large des voies de traductions non-conventionnelles comme sources de pCMH-I (Yewdell et al., 1996; Schwab et al., 2003; Ho and Green, 2006; Starck and Shastri, 2011). Jusqu'ici, la majorité des antigènes ciblés dans le cadre de stratégies de vaccination thérapeutique est produite à partir d'exons traduits dans un cadre de lecture ouvert (ORF) canonique. Cependant, des études de peptidomique basées sur la spectrométrie de masse ont révélé qu'une part importante des pCMH-I dérive des régions présumées non-codantes du génome telles que les introns, les jonctions intron-exon ou les région UTR (Laumont et al., 2016, 2018). Nous avons donc étudié les voies de production de ces peptides antigéniques non-conventionnels notamment ceux dérivant des séquences introniques. Nous avons utilisé un test de présentation antigénique *in vitro* basé sur la reconnaissance de l'épitope immunodominant SIINFEKL (SL8) de l'ovalbumine présenté dans une molécule H-2K<sup>b</sup> par des hybridomes B3Z de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du complexe SL8/H-2K<sup>b</sup>. Un criblage de plusieurs séries de petites molécules chimiques nous a permis d'identifier des immunomodulateurs de la voie de présentation antigénique par le CMH-I. Nous avons étudié leurs mécanismes d'action et leurs propriétés antitumorales sur le modèle murin. Par la suite, nous avons étudié l'effet du composé immunomodulateur IP2 sur l'immunopeptidome du CMH-I et avons identifié les antigènes induits par le traitement à la surface cellulaire. Nous avons alors élaboré une nouvelle stratégie d'immunothérapie consistant en la combinaison d'un composé immunomodulateur et d'un vaccin peptidique. Nous avons enfin testé d'autres combinaisons de traitement et identifié des agents multi-cibles avec une forte activité antitumorale.

## Identification des immunomodulateurs et de leur(s) mode(s) d'action

Le test de présentation antigénique *in vitro* que nous avons exploité dans cette étude avait auparavant permis de montrer que l'inhibition de l'export nucléaire des ARNm par la leptomycine B ou l'inhibition du splicéosome par l'isoginkgetine conduisaient toutes deux à une augmentation de la présentation de l'épitope SIINFEKL dans les molécules du CMH-I à la surface cellulaire (Apcher et al., 2013a). Dans cette étude, nous montrons qu'un autre inhibiteur du splicéosome, la madrasine, ainsi qu'une autre famille de molécules multi-cibles (CoSMIT) partagent ce même effet sur la présentation antigénique.

Les composés isoginkgetine et madrasine ont un mécanisme d'action commun sur le splicéosome. Les deux molécules empêchent le recrutement des ribonucléoprotéines (snRNP) U4/U5/U6 et bloquent ainsi la transition du complexe A vers un complexe B stable (**Figure 52**) (O'Brien et al., 2008; Pawellek et al., 2014). Dans le cas de l'isoginkgetine, O'Brien et al. montrent que l'isoginkgetine induit l'accumulation dans le noyau des pré-ARNm de différents transcrits endogènes codant par exemple pour l'actine ou la  $\beta$ -tubuline. D'autres inhibiteurs du splicéosome comme le pladienolide B (PDB) ou la spliceostatine A (SSA) induisent une accumulation de pré-ARNm dans le noyau (Kaida et al., 2007; Kotake et al., 2007). En revanche, ces derniers interagissent avec des composants plus en amont dans la chaîne catalytique d'épissage des introns. Le PDB et la SSA ciblent la protéine SF3B1 de la sous-unité U2 du splicéosome et empêchent donc la formation d'un complexe A stable.



**Figure 52:** Etapes de l'assemblage du splicéosome (adapté de Turunen et al., 2013).

Les inhibiteurs du spliceosome, comme l'inhibiteur de l'export nucléaire leptomycine B, conduisent donc à une accumulation de pré-ARNm dans le noyau et à une augmentation de la présentation antigénique dans le contexte des molécules du CMH-I dans les cellules tumorales. Nous faisons donc l'hypothèse que l'accumulation de ces ARNs non matures dans le noyau accroît la quantité de substrats pour les mécanismes de traduction non-conventionnelle tels que ceux à l'origine des *Pioneer Translation Products* (Apcher et al., 2013a). A. Pierson confirme par ailleurs sur le modèle SL8/H-2K<sup>b</sup> que l'augmentation de la présentation antigénique observée avec l'isoginkgetine est bien le résultat de l'inhibition du mécanisme d'épissage car aucun effet n'est observé dans des cellules transfectées avec un cDNA codant pour le SL8 (voir **Annexe 1**). La régulation de la voie de présentation antigénique par le CMH-I par les mécanismes d'épissage alternatif a également été prouvée sur d'autres modèles antigéniques. L'exclusion de la séquence contenant l'épitope immunodominant FLR de la protéine EBNA-3 du virus d'Epstein-Barr au cours d'un événement d'épissage compromet, par exemple, la reconnaissance des cellules infectées par les CTLs spécifiques du complexe FLR/HLA-B8 (Kienzle et al., 2000).

Si l'isoginkgetine, la madrasine, leurs dérivés ainsi que les composés multi-cibles augmentent tous la présentation antigénique de l'épitope SL8 exprimé à partir d'un intron dans les cellules MCA205 et B16F10, nos travaux suggèrent que leurs mécanismes d'actions ne sont pas strictement identiques. L'analyse différentielle de l'expression des gènes et des événements d'épissage alternatifs induits par le composé IP2 et la molécule d'isoginkgetine parentale montre des profils d'activités proches mais pas identiques (2.3 IP2 et l'isoginkgetine ont des activités proches mais non identiques). Le composé IP2 est obtenu par phosphorylation de l'isoginkgetine sur deux positions (**Figure 18**) afin de rendre le composé hydrosoluble. Nos résultats suggèrent que cette modification chimique a modifié l'activité biologique de la molécule d'origine. Ainsi, IP2 et l'isoginkgetine partagent des propriétés d'inhibition de l'épissage mais nous pensons qu'ils n'ont pas la même spécificité d'action. De même, il serait intéressant de réaliser une analyse différentielle des gènes et des événements d'épissage régulés par la madrasine et ses dérivés car si l'isoginkgetine et la madrasine bloquent toutes deux l'assemblage du spliceosome au niveau du complexe A, nous pouvons faire l'hypothèse que les deux composés régulent l'épissage d'ARNs différents. Par ailleurs, les composés CoSMIT\_1, Co\_SMIT\_2 et CoSMIT\_3 augmentent la présentation du SL8 dans les cellules MCA205 mais nous ne connaissons pas leur mécanisme d'action et ne savons pas s'il est lié à une inhibition du spliceosome.

Compte tenu de la complexité de la voie de présentation antigénique par le CMH-I (**Figure 8**), l'augmentation de la présentation d'un épitope à la surface cellulaire peut être le résultat de plusieurs mécanismes différents affectant la production, le transport et/ou l'apprêtement des antigènes. Parmi les effets décrits de l'isoginkgetine, l'inhibition de la particule 20S du protéasome peut avoir des répercussions directes sur la présentation antigénique. En effet, il a été montré que l'isoginkgetine inhibe les trois activités protéolytiques du protéasome (trypsin-like, chymotrypsin-like et caspase-like) ce qui induit une inhibition de la synthèse protéique et une accumulation de protéines ubiquitinylées (Tsalikis et al., 2019). Son effet est comparable à celui de l'inhibiteur du protéasome MG132 qui inhibe uniquement l'activité chymotrypsin-like du protéasome. Dès lors, il peut paraître contradictoire que l'isoginkgetine augmente la présentation antigénique alors que MG132 et d'autres inhibiteurs du protéasome montrent un effet opposé (Rock et al., 1994). En réalité, cette observation confirme l'importance des voies de production des épitopes du CMH-I indépendantes du protéasome (Vinitsky et al., 1997; Luckey et al., 1998; Seifert et al., 2003) qui concernent notamment les peptides endogènes courts de moins de 17 acides aminés (Yang et al., 1996) et invite à reconsidérer la contribution de la dégradation protéasomale dans la génération de pCMH-I (3.1 Deux modèles complémentaires). L'inhibition du protéasome par l'isoginkgetine pourrait donc conduire à la production préférentielle de pCMH-I à partir de peptides produits par des événements de traduction non-conventionnelle tels que ceux conduisant à la synthèse des DRiPs et des PTPs. L'effet du composé IP2 sur l'activité du protéasome est en cours d'évaluation pour déterminer si le dérivé a conservé cette propriété de la molécule parentale. Par ailleurs, d'autres propriétés biologiques pourraient expliquer l'augmentation de la présentation antigénique observée notamment avec les composés CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3 pour lesquels seule une activité antivasculaire a été identifiée jusqu'à présent. L'agent déméthylant 5-aza-2-deoxycytidine augmente par exemple l'expression de l'antigène cancer/testis (CT) PRAME et induit celle du CT SSX-2 chez des patients atteints d'AML (Atanackovic et al., 2011). Dans le traitement du mélanome, l'utilisation des inhibiteurs des désacétylases d'histones (HDACIs) (Shen et al., 2016) ou des inhibiteurs de la voie de signalisation MAPK (Boni et al., 2010) augmentent l'expression des antigènes de différenciation des mélanocytes (MDA) tels que gp100. A un autre niveau de régulation de la voie de présentation antigénique par le CMH-I, nous avons cherché à savoir si le composé IP2 augmentait le nombre de molécules de classe I à la surface cellulaire. Cet effet est observé avec de nombreux composés tels que le cisplatine, la gemcitabine, les inhibiteurs des tyrosines kinases, les interférons ou les agonistes des TLR (de Charette et al., 2016) et peut

expliquer l'augmentation de la présentation antigénique. Cependant, les analyses en cytométrie en flux que nous avons menées nous ont permis d'exclure ce mode d'action pour le composé IP2 (**Figure 21** et **Figure 22**). Enfin, du côté de l'apprêtement des peptides dans les molécules du CMH-I, nous pourrions envisager un effet des composés immunomodulateurs sur les protéines chaperonnes. En effet, les agonistes du CD40 (Łuczyński et al., 2007), les HDACIs (Khan et al., 2008) ou les agents déméthylant (Manning et al., 2008) augmentent par exemple l'expression des molécules TAP1 et TAP2 dont l'activité conditionne l'immunogénicité de la tumeur (Johnsen et al., 1999). Un tel effet pourrait expliquer que l'on retrouve plus de complexes SL8/H-2K<sup>b</sup> à la surface cellulaire après traitement avec les composés immunomodulateurs.

Pour poursuivre notre étude de l'activité antitumorale des composés *in vivo*, nous avons synthétisé des dérivés hydrosolubles de l'isoginkgetine et de la madrasine. Le dérivé IP2 de l'isoginkgetine, les dérivés Madra.HCl et EYP59 de la madrasine, ainsi que les composés CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3 inhibent la croissance tumorale des sarcomes MCA205, augmentent la survie globale et induisent une protection à long terme associée à une réponse mémoire. Une étude plus approfondie du composé IP2 a montré que ses propriétés antitumorales étaient dépendantes du système immunitaire et de la réponse T CD8<sup>+</sup>. Des études similaires doivent être poursuivies pour les autres composés.

Les effets observés *in vivo* après traitement avec les différents composés doivent être le reflet des propriétés observées *in vitro* c'est-à-dire une augmentation de la présentation antigénique pour tous les composés, une activité cytotoxique pour tous les composés à l'exception d'IP2 et EYP59 et une activité antivasculaire pour CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3. Cette dernière activité s'est manifestée *in vivo* par la « nécrose » des tumeurs MCA205 traitées en intra-tumoral et par leur régression complète (**Figure 50**). Nous n'avons pas déterminé avec précision le type de mort cellulaire induite par les composés antivasculaires. Nous pourrions par exemple distinguer la mort par apoptose de la mort par nécrose en comparant différents biomarqueurs moléculaires tels que le taux de cytokératine 18 complète (FK18) et le taux de cytokératine 18 clivée (CK18) (Krysko et al., 2008; Yang et al., 2014). La question est plutôt de savoir si la mort cellulaire induite par les composés est immunogène. En effet, l'ICD s'accompagne du relargage de DAMPs qui promeuvent le recrutement des APCs dans le TME. Ces APCs peuvent alors internaliser ces motifs et déclencher la réponse immunitaire adaptative (Kroemer et al., 2013). Des expériences de vaccination *in vivo* sur des modèles

immunocompétents et immunodéficients permettent d'identifier les composés inducteurs de l'ICD (Kepp et al., 2014). Il existe aussi des techniques de criblage à haut débit plus adaptées pour tester une banque de molécules et qui reposent sur la détection de la calréticuline à la surface cellulaire ainsi que la quantification de l'ATP et de l'HMGB1 dans le milieu extracellulaire (Kepp et al., 2014). L'induction de l'ICD n'est pas un mécanisme d'action envisageable pour le composé IP2 car nous avons montré que ce dernier n'est pas cytotoxique pour les cellules tumorales (**Figure 19**) et qu'il ne déclenche pas l'entrée en apoptose (**Figure 20**). Nous avons montré grâce au modèle SL8/H-2Kb que l'activité du composé IP2 reposait sur une activation et une prolifération de CTLs spécifiques. En effet, nous avons observé une prolifération accrue des LT CD8<sup>+</sup> OT-1 spécifiques du complexe SL8/H-2Kb après conditionnement des cellules tumorales MCA205 globin-SL8-intron avec le composé IP2 (**Figure 28**). Nous faisons l'hypothèse que le traitement avec IP2 induit *in vivo* une surexpression de l'épitope immunogène SL8 à la surface cellulaire ce qui augmente la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire adaptatif. Par ailleurs, l'activité antitumorale du composé IP2 est plus forte sur les cellules MCA205 globin-SL8-intron qui expriment l'épitope immunodominant de l'OVA que sur les cellules MCA205 WT. Le SL8 est un épitope très immunogène : son affinité pour les molécules H-2Kb est forte (<20 nM) et il dérive d'un antigène qui n'est pas exprimé chez la souris, il n'est donc pas soumis au processus de sélection thymique. Les rejets de tumeurs MCA205 globin-SL8-intron observés chez certaines souris après traitement avec IP2 (voir **Annexe 1**) pourraient être le résultat de l'élimination indirecte des ALVs déjà discutée dans la partie introductive (voir 3.1 Antigènes associés à la tumeur (TAAs) et antigènes spécifiques de la tumeur (TSAs)). En effet, si la cellule tumorale exprime l'épitope SL8 à un niveau suffisant, elle est reconnue et lysée par les CTLs spécifiques. Les cellules du stroma peuvent alors à leur tour présenter l'épitope à leur surface et servir d'APCs pour la stimulation des LT CD8<sup>+</sup> (Spiotto et al., 2004). Cette hypothèse corrobore une observation effectuée dans les modèles tumoraux globin-SL8-intron et WT : si la croissance tumorale est contrôlée pendant la durée du traitement avec IP2, elle progresse rapidement dès l'arrêt du traitement. Le traitement avec IP2 module le répertoire des peptides présentés à la surface cellulaire et induit la présentation d'épitopes immunogènes (voir 4. Stratégies de vaccination peptidique – Combinaisons IP2/peptide). Dès lors nous pouvons penser que dès l'interruption du traitement avec IP2 des ALVs peu immunogènes se développent et sont responsables de la progression tumorale. Les résultats obtenus sur les modèles tumoraux WT montrent par ailleurs que l'expression de l'épitope SL8 n'est pas indispensable pour observer l'activité antitumorale du composé IP2 et des composés multi-

cibles CoSMIT\_1, CoSMIT\_2 et CoSMIT\_3. Nous avons montré que le composé IP2 redessine l'immunopeptidome du CMH-I dans les cellules tumorales (voir 3. Effet d'IP2 sur l'immunopeptidome du CMH I). L'induction de nouveaux pCMH-I immunogènes à la surface cellulaire peut expliquer la réponse immunitaire antitumorale observée.

### **Etude peptidomique basée sur la spectrométrie de masse**

Nous avons étudié l'effet du composé IP2 sur l'immunopeptidome du CMH-I dans les cellules tumorales. Nous avons pour cela adopté une démarche de peptidomique par spectrométrie de masse. Nous avons procédé à l'immunoprécipitation des complexes peptide/H-Kb et peptide/H-2Db à la surface cellulaire puis à l'élution des peptides en milieu acide et enfin à leur caractérisation par spectrométrie de masse. A partir des données de RNA-seq, nous avons construit deux bases de données personnalisées : une base de données « All frame » qui permet l'identification des peptides de 8 à 12 acides aminés dérivant de l'ensemble des régions du génome murin et une base de données « Retained Intron » qui permet l'identification spécifique des peptides dérivés des introns retenus au cours d'un événement d'épissage alternatif. Nous avons également utilisé le protéome murin disponible sur UniProt pour identifier spécifiquement les peptides dérivés des régions codantes (exons). Grâce à cette étude, nous avons montré que le composé IP2 induit un remodelage complet de l'immunopeptidome du CMH-I dans les cellules tumorales. Nous avons identifié des peptides enrichis à la surface cellulaire après traitement (voir 3.1 IP2 modifie la présentation d'épitopes conventionnels et non-conventionnels) ainsi que des néoantigènes spécifiques du traitement (voir 3.2 IP2 induit des néoantigènes à la surface des cellules tumorales). De manière intéressante, les pCMH-I identifiés dérivent d'exons mais également de séquences présumées non codantes telles que les introns, les séquences intergéniques, les séquences promotrices ou amplificatrices.

La peptidomique basée sur la spectrométrie de masse a été utilisée dans plusieurs études pour identifier les variations induites par un traitement sur l'immunopeptidome du CMH-I. Ainsi, il a été montré que les antimétabolites gemcitabine (Gravett et al., 2018) et décitabine (Bauer et al., 2018), les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$  (Javitt et al., 2019) ou l'inhibiteur de la kinase mTOR rapamycine (Caron et al., 2011) modifient qualitativement et quantitativement le répertoire de peptides présentés par les molécules du CMH-I à la surface

cellulaire. Cependant, dans ces études, l'identification des peptides présentés à la surface cellulaire s'effectue sur le protéome murin ou humain disponible sur UniProt. On peut donc conclure sur la plasticité de l'immunopeptidome uniquement pour les antigènes dérivés des séquences exoniques du génome. La plasticité du répertoire des pCMH-I d'origines non-conventionnelles n'a pas encore été définie même si l'on sait qu'en conditions de stress oxydatif, par exemple, la traduction non-canonique des régions 5'UTR prévaut sur la traduction canonique des exons (Gerashchenko et al., 2012; Starck et al., 2016). D'un point de vue qualitatif et toutes origines confondues, nous avons observé un enrichissement en peptides courts de 8 ou 9 acides aminés (**Figure 29**) avec une forte affinité pour le CMH-I (résultat non présenté). Ces deux observations sont liées car les peptides courts répondent mieux aux critères de liaison physico-chimiques du CMH-I (Rammensee et al., 1997). Cet enrichissement en peptides courts après traitement avec IP2 peut également refléter un enrichissement en peptides d'origines non-conventionnelles qui sont significativement plus courts que les peptides d'origine conventionnelle (Laumont et al., 2016). Néanmoins, l'analyse quantitative réalisée sur Progenesis à partir des données de MS/MS montre qu'une grande partie des épitopes significativement enrichis à la surface cellulaire après traitement avec IP2 ou des néoantigènes induits par IP2 ont une longueur supérieure à 10 acides aminés (**Figure 30 à 37**) et par conséquent une affinité prédictive pour le CMH-I faible (>500 nM). Nous n'avons volontairement pas appliqué de critère de sélection basé sur l'affinité pour le CMH-I dans notre étude car, d'une part, une molécule de CMH-I peut accueillir des peptides longs dans son sillon sous certaines conditions (Hörig et al., 1999) et, d'autre part, certains épitopes avec une affinité prédictive supérieure à 500 nM ont prouvé leur immunogénicité *ex vivo* et *in vivo* (Duan et al., 2014; Laumont et al., 2016). Nous reconnaissons que ce choix ne permet pas de réduire le nombre des potentiels faux positifs dans notre étude. Nous avons identifié des épitopes provenant de séquences présumées non-codantes du génome telles que les introns, les éléments cis-régulateurs ou les séquences intergéniques qui sont une source majeure de TSAs (Laumont et al., 2018). Parmi les épitopes dérivant d'exons, nous retrouvons des épitopes identifiés dans des études précédentes et référencés sur l'IEDB mais également de nouveaux épitopes. Il pourrait s'agir d'exons traduits dans des cadres de lectures alternatifs qui représentent près de la moitié des pCMH-I cryptiques (Laumont et al., 2016) mais cette hypothèse doit être vérifiée en recherchant les cadres de lecture et les codons d'initiation correspondants. Enfin, grâce à la base de données « Retained Introns » générée à l'aide de l'outil « keep me around » (Pimentel et al., 2015) nous avons pu confirmer que les introns retenus étaient une source de pCMH-I (Smart et al., 2018). L'immunogénicité des

épitopes dérivés des introns retenus n'a jamais été validée en clinique. Cependant, des CTLs spécifiques d'un épitope dérivé d'un intron retenu de l'ARNm de TRP-2 ont pu être détectés dans le cas du mélanome (Lupetti et al., 1998). Il pourrait donc être intéressant de moduler l'épissage alternatif avec des composés inhibiteurs du spliceosome comme l'isoginkgetine et son dérivé IP2 dans ces modèles tumoraux potentiellement sensibles à une vaccination avec des néoantigènes dérivés d'introns retenus.

Notre étude de peptidomique nous a également permis d'identifier différentes catégories de néoantigènes affectés par le traitement avec IP2. Tout d'abord, le composé IP2 augmente la présentation d'épitopes mutés à la surface des cellules MCA205 et B1610. Ces épitopes sont spécifiques de la cellule tumorale et sont potentiellement très immunogènes car il ne sont pas soumis à la sélection thymique (Yarchoan et al., 2017). Par ailleurs, certains épitopes mutés ne sont retrouvés qu'après traitement des cellules tumorales avec IP2 ce qui leur confère une double spécificité pour la cellule cancéreuse et le traitement (**Tableau 3** et **Tableau 4**). De manière intéressante, nous avons également identifié des antigènes anormalement exprimés (aeTA) après traitement avec IP2. Il s'agit dans notre cas d'épitopes qui ne contiennent pas de mutation mais que l'on retrouve uniquement après traitement avec IP2. Nous ne sommes pas à l'heure actuelle en mesure de savoir s'ils sont également exprimés par les cellules saines traitées avec IP2. L'activité d'inhibition de l'épissage du composé IP2 peut expliquer que le traitement induit la rétention d'un intron qui est alors traduit et génère un pCMH-I. Concernant les antigènes générés à partir d'exons uniquement après traitement avec IP2, nous pouvons envisager que l'altération du mécanisme d'épissage conduit à un décalage du cadre de lecture et à la traduction d'un exon hors du cadre de lecture principal. Les aeTSAs sont particulièrement intéressants dans le développement de vaccins thérapeutiques car ils peuvent être partagés entre différentes tumeurs (Gee et al., 2018) alors que les néoantigènes mutés sont généralement spécifiques d'une tumeur (Laumont et al., 2018). Nous n'observons pas dans notre étude d'aeTSAs communs entre les cellules de sarcome MCA205 et de mélanomes B16F10 mais nous pouvons envisager que le composé IP2 induit spécifiquement l'expression anormale d'une région du génome dans plusieurs modèles tumoraux.

## **Stratégies de vaccination peptidique**

Après avoir identifié par spectrométrie de masse les épitopes enrichis ou induits à la surface

des cellules MCA205 et B16F10, nous avons synthétisé des SLPs contenant les épitopes les plus prometteurs et déterminé leur immunogénicité *ex vivo* par un test ELISpot IFN $\gamma$  et un test ELISA IL-2. L'association des peptides dans des groupes d'immunisation puis leur déconvolution permet un criblage à débit « moyen » fréquemment employé pour déterminer l'immunogénicité des néoantigènes (Garcia-Garijo et al., 2019). Dans ces tests *ex vivo*, nous avons utilisé des SLPs et non la séquence minimale de l'épitope retrouvé à la surface cellulaire. Les SLPs sont constitués de l'épitope en position centrale flanqué de part et d'autre par les acides aminés naturellement présents dans la protéine d'origine. Nous faisons l'hypothèse que si l'épitope est retrouvé à la surface cellulaire alors une APC peut transformer le SLP contenant l'épitope pour générer la séquence minimale correspondante. En utilisant les SLPs dans les mêmes conditions pour les tests d'immunogénicité *ex vivo* et de vaccination *in vivo* nous nous assurons que les peptides immunogènes sélectionnés *ex vivo* génèrent une population de cellules T CD8<sup>+</sup> réactives *in vivo*. Il serait intéressant de réaliser le test ELISpot IFN $\gamma$  avec les séquences minimales pour s'assurer que les cellules T CD8<sup>+</sup> réactives identifiées sont bien spécifiques de l'épitope retrouvé à la surface cellulaire et non d'une séquence flanquant l'épitope. Comme nous l'avons déjà mentionné, les SLPs MCA205 KB-1 et MCA205 KB-22 d'une part, ainsi que les SLPs MCA205 DB-9 et MCA205 DB-16, d'autre part, contiennent le même épitope mais les séquences flanquant l'épitope sont différentes. De manière intéressante, nous avons pu observer que le SLP MCA205 KB-22 était moins immunogène que le SLP MCA205 KB-1 (**Figure 39** et **Figure 40**). Ce résultat met en lumière l'importance des séquences flanquant l'épitope pour la génération de CTLs réactifs. La séquence du SLP peut être optimisée au niveau de chaque résidu pour favoriser la génération de l'épitope ciblé (Steers et al., 2014; Jallow et al., 2015). Nous précisons ici que c'est bien le SLP MCA205 KB-1, plus immunogène, qui a été utilisé dans les stratégies de vaccination *in vivo*.

A la suite de cette pré-sélection des peptides candidats par ELISpot IFN $\gamma$  et ELISA IL-2, nous avons inclus trois peptides dans des stratégies de vaccination sur le modèle MCA205 et quatre sur le modèle B16F10. Parmi ces peptides, on retrouve deux TAAs surexprimés après traitement avec IP2 (MCA205 KB-1 et B16F10 KB-5), trois aeTAs exprimés uniquement après traitement avec IP2 (B16F10 DB-1, B16F10 DB-2 et B16F10 DB3) et deux TSA mutés (MCA205 KB-10 et MCA205 KB-16). Nous avons évalué le potentiel antitumoral de ces peptides en combinaison avec IP2 dans un cadre prophylactique ou thérapeutique. La vaccination prophylactique est généralement efficace pour prévenir le développement d'un

cancer notamment d'origine virale (HPV, HBV, HCV, etc) mais reste en étude pour les autres types de tumeurs (Finn and Forni, 2002). On peut envisager l'utilisation de vaccins prophylactiques après résection ou traitement de la tumeur pour empêcher les rechutes ou les métastases, on parle alors de prévention tertiaire du cancer (Lollini et al., 2015). Le développement de vaccins thérapeutiques est quant à lui nécessaire pour traiter des patients qui ont une tumeur établie. Les séquences de traitement que nous avons choisies sont en accord avec les mécanismes biologiques mis en jeu et les contraintes expérimentales. En effet, en fonction de l'antigène ciblé, la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique de l'antigène atteint un pic 7 à 14 jours après vaccination avant d'entrer dans une phase de contraction associée à la persistance d'une population réduite de cellules mémoires représentant 5 à 10% de la population initiale (Williams and Bevan, 2007). Dans le cadre de la vaccination prophylactique nous avons donc attendu l'établissement d'une réponse mémoire après l'amorce et injecté les cellules tumorales au pic de la réponse effectrice (voir 6. Combinaison drogue/peptide – Vaccination prophylactique). Dans le cadre de la vaccination thérapeutique, les LTs sont maintenus en phase effectrice par des immunisations hebdomadaires (voir 7. Combinaison drogue/peptide – Vaccination thérapeutique). Le traitement avec IP2 est poursuivi tout au long de l'expérience pour maintenir le contrôle sur l'immunopeptidome du CMH-I des cellules tumorales.

A l'exception des combinaisons entre IP2 et les SLPs DB-2 (B16F10) et KB-1 (MCA205) dont nous discuterons par la suite, nous observons dans les meilleurs cas que les combinaisons ne constituent pas des améliorations par rapport au composé IP2 seul mais que certains SLPs abolissent même l'activité de l'immunomodulateur. Ce résultat illustre l'échec de beaucoup de vaccins thérapeutiques chez l'homme : ces vaccins sont capables d'induire une réponse immunitaire, mesurée ici par ELISPOT IFN $\gamma$ , mais celle-ci ne se traduit pas par une réponse clinique (Jacobs et al., 2014). Plusieurs raisons peuvent expliquer ces échecs, différentes en fonction de la nature du SLP. En effet, l'épitope contenu dans le SLP B16F10 KB-5 dérive d'un intron retenu, il est présenté par les cellules MCA205 et enrichi après traitement avec IP2. Nous ne disposons pas de base de données publique pour les épitopes cryptiques tels que les épitopes dérivés d'introns retenus mais si cet épitope est également exprimé par les cellules du tissu sain, il est soumis à la sélection thymique. Ainsi, les LT CD8<sup>+</sup> générés au cours la vaccination thérapeutique ont, au mieux, une réactivité limitée contre les cellules présentant l'antigène en question (Xing and Hogquist, 2012). La raison de l'échec de la combinaison entre le SLP MCA205 KB-10 et le composé IP2 est différente. Le SLP MCA205

KB-10 est constitué d'un néoantigène muté induit par le traitement avec IP2. Il est donc spécifique de la cellule tumorale et d'un traitement avec IP2 et n'est pas soumis aux mécanismes de tolérances centrale et périphérique. En revanche, la vaccination thérapeutique stimule à la fois les populations effectrices et régulatrices (Zhou et al., 2006). Ainsi, l'activité thérapeutique du vaccin composé du SLP MCA205 KB-10 peut être annulée par la prolifération de Treg FOXP3<sup>+</sup> spécifiques de néoantigènes mutés au cœur de la tumeur (Ahmadzadeh et al., 2019). Des études ont également mis en évidence la forte hétérogénéité d'expression des néoantigènes dans une tumeur corrélée à l'hétérogénéité génétique intratumorale (Fennemann et al., 2019). Dans l'adénocarcinome pulmonaire, un séquençage du TCR des LT identifiés dans différentes zones de la tumeur montre par exemple que la majorité des clones est restreinte à une certaine région (Reuben et al., 2017). Dans le cas de l'épitope muté MCA205 KB-10 induit par le traitement avec IP2, l'hétérogénéité d'expression du néoantigène peut être accentuée par la différence d'accès au traitement des cellules tumorales en fonction de leur localisation dans la tumeur. Enfin, nous avons identifié ces néoantigènes *in vitro* en éluant les peptides présentés à la surface d'une monocouche de cellules tumorales traitées avec IP2. L'immunopeptidome du CMH-I est le reflet de l'activité métabolique et des mécanismes de régulation intracellulaires qui sont dépendants de l'environnement de la cellule (Caron et al., 2011). Nous réalisons à présent l'immunoprécipitation *ex vivo*, à partir d'une tumeur prélevée sur la souris, afin de vérifier que le traitement avec IP2 induit les mêmes épitopes *in vitro* et *in vivo*.

La combinaison la plus efficace dans notre étude, en thérapeutique comme en prophylactique, est celle du composé IP2 avec le SLP MCA205 KB-1. L'épitope ciblé est le nonapeptide TNQDFIQRL produit à partir d'un exon du gène codant pour la nischarine (NISCH<sub>602-608</sub>) (Dong et al., 2019; Maziveyi et al., 2019). Il est présenté à un niveau basal par les cellules MCA205 mais il est enrichi plus de cent fois à la surface cellulaire après traitement avec IP2. L'épitope est référencé sur l'IEDB dans huit études de peptidomique basée sur la spectrométrie de masse. Dans l'atlas de l'immunopeptidome du CMH-I murin dressé par Schuster et al., l'épitope est détecté dans 17 tissus (Schuster et al., 2018). L'analyse différentielle d'expression des gènes ne montre pas de régulation par le composé IP2 au niveau transcriptomique (résultat non présenté) et nous n'avons pas déterminé l'effet du composé sur l'abondance de la protéine. En revanche, des études réalisées dans le cancer du sein révèlent une expression significativement réduite de la nischarine, au niveau transcriptomique et au niveau protéique, dans le tissu cancéreux en comparaison avec le tissu

sain (Baranwal et al., 2011; Chen et al., 2015b). Ces résultats suggèrent que l'antigène de la nischarine est un TAA surexprimé uniquement après traitement avec IP2 et pas constitutivement par les cellules tumorales comme peuvent l'être les antigènes HER-2/neu, p53 ou survivine (Vigneron, 2015). La principale limite associée à l'utilisation d'un tel antigène réside dans la précision de la quantification du taux d'expression de l'antigène dans la tumeur en comparaison avec le tissu sain. La vaccination avec le SLP MCA205 KB-1 seul n'a aucun effet sur la croissance tumorale des MCA205 WT (**Figure 41** et **Figure 43**) et ne déclenche pas de réaction auto-immune chez la souris. Cette observation suggère que le niveau basal d'expression de l'antigène par la cellule tumorale ou le tissu sain n'est pas suffisant pour permettre la reconnaissance par les CTLs. En revanche, le seuil d'expression est franchi après traitement avec IP2 car la combinaison IP2/peptide montre une activité antitumorale en prophylactique comme en thérapeutique. Ici encore, il convient de vérifier la surexpression de l'antigène MCA205 KB-1 à la surface des tumeurs MCA205 traitées *in vivo* avec le composé IP2. Dans le cas du mélanome et de l'épitope gp100, le seuil d'expression de l'antigène de différenciation nécessaire pour sa reconnaissance par des CTL spécifiques correspond à un seuil d'expression de l'ARNm correspondant (Riker et al., 2000). Or, IP2 n'a pas d'effet sur l'abondance relative, exprimée en FPKM, du transcrite codant pour l'épitope de la nischarine. Nous pouvons faire l'hypothèse que la mutation A/D de l'acide aminé précédent l'épitope dans le SLP MCA205 KB-1 favorise sa transformation et sa présentation par les APCs ce qui explique sa sur-représentation à la surface cellulaire.

Les résultats obtenus avec les différents SLPs en combinaison avec IP2 illustrent l'importance du choix de l'antigène ciblé dans le cadre d'une stratégie de vaccination. Les critères d'expression, de spécificité et d'immunogénicité de l'antigène dictent l'efficacité de la réponse antitumorale générée par le vaccin thérapeutique (Hollingsworth and Jansen, 2019). Nous avons mis en évidence que l'activité antitumorale du composé IP2 reposait sur une réponse immunitaire dirigée contre des antigènes tumoraux régulés par le traitement tels que MCA205 KB-1, MCA205 KB-16 ou B16F10 DB-2. Cependant, l'efficacité relative des combinaisons peptide/IP2 suggère que les épitopes précédemment cités ne sont pas les seuls impliqués et que leur ciblage spécifique dans un vaccin ne suffit pas à éliminer complètement la tumeur.

## Combinaisons de traitements

Les vaccins thérapeutiques contre le cancer ont montré une activité limitée quand ils sont utilisés en monothérapies (Zhao et al., 2019). Ils sont efficaces pour générer des réponses cellulaires spécifiques dirigées contre des antigènes tumoraux mais souffrent des mécanismes d'immunoédition tumorale qui permettent à la tumeur d'échapper à l'immunosurveillance (Schreiber et al., 2011). Sur le modèle des MCA205 WT, nous n'avons pas observé de synergie entre le composé IP2, combiné ou non avec un vaccin peptidique, et un traitement anti-PD-1 (**Figure 47**). Cependant, la combinaison des vaccins thérapeutiques et des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICB) est bénéfique sur des modèles tumoraux initialement résistant aux ICB comme les tumeurs cérébrales (Antonios et al., 2016) ou pancréatiques (Soares et al., 2015). Dès lors, nous envisageons de réévaluer la combinaison du composé IP2 avec un traitement anti-PD-1 sur des modèles tumoraux faiblement immunogènes, ou « froids », qui ne sont pas initialement infiltrés par des CTLs spécifiques d'un ou plusieurs antigène(s) tumoral(aux) (Curran and Glisson, 2019).

Notre étude des composés CoSMIT montre l'intérêt de combiner un composé immunomodulateur comme IP2 qui augmente la réponse immunitaire dirigée contre des antigènes tumoraux avec un composé antivasculaire qui affaiblit la tumeur et réduit l'environnement suppresseur. Nous proposons ici des composés multi-cibles combinant les deux activités. Nous avons observé *in vivo* que l'activité antitumorale des composés antivasculaires et immunomodulateurs CoSMIT\_1 et CoSMIT\_2 est supérieure à celle du composé IP2 pour lequel nous n'avons décrit qu'une activité immunomodulatrice (**Figure 50**). Cependant, nous n'avons pas évalué la contribution relative de chacune des activités des composés multi-cibles dans leur effet antitumoral. A cet effet, nous pourrions comparer l'efficacité des composés multi-cibles antivasculaires et immunomodulateurs CoSMIT\_1 et CoSMIT\_2 avec des traitements anti-angiogéniques comme le bevacizumab ou évaluer leur effet dans des souris immunodéficientes. Par ailleurs, nous avons observé que les souris qui connaissent une régression complète de leur tumeur après traitement avec CoSMIT\_1 et CoSMIT\_2 en intra-tumoral développaient une protection à long terme contre cette tumeur (**Figure 51**). En pratique, nous pourrions évaluer l'ampleur de la réponse mémoire induite par les composé multi-cibles et notamment l'induction d'un effet abscopal en soumettant les souris à une deuxième injection controlatérale de cellules tumorales sur le flanc gauche.

## Conclusions et perspectives

---

L'usage de l'immunothérapie dans le traitement des cancers est une pratique qui remonte aux années 1990. L'interféron alpha 2 (IFN- $\alpha$ 2) et le BCG puis l'interleukine 2 (IL-2) sont les premiers agents immunomodulateurs à recevoir une autorisation de la FDA pour leurs propriétés antitumorales. L'approfondissement des connaissances sur l'immunologie des cancers et notamment sur les mécanismes d'immunoédition tumorale ont ensuite conduit au développement des anticorps inhibiteurs des points de contrôle immunitaire CTLA-4 et PD-1. L'ipilimumab (anti-CTLA-4) puis le pembrolizumab et le nivolumab (anti-PD-1) obtiennent l'accord de la FDA pour le traitement du mélanome métastatique en 2011 et 2014, respectivement. Malgré certains résultats spectaculaires, la réponse aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaire n'est pas généralisée et la mise en place de mécanismes de résistance peut également conduire à la rechute des patients répondeurs. L'immunogénicité de la tumeur est un critère essentiel de réponse aux immunothérapies. Les mécanismes d'immunoédition tumorale qui contribuent à la perte d'expression des antigènes tumoraux et des molécules associées à l'apprêtement et à la présentation de ces antigènes favorisent l'échappement de la tumeur au système immunitaire.

Dans le cadre des différents projets menés au cours ma thèse, nous avons identifié de nouveaux agents immunomodulateurs qui augmentent la présentation antigénique dans les cellules tumorales. Nous avons tout d'abord mis en évidence les propriétés du composé IP2, un dérivé hydrosoluble et non-toxique d'un inhibiteur de l'assemblage du splicéosome, l'isoginkgetine. Le composé IP2 redessine l'immunopeptidome du CMH-I des cellules tumorales et exerce une activité antitumorale médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques des antigènes tumoraux induits par le traitement. Par la suite, nous avons montré que l'effet de l'isoginkgetine et du composé IP2 sur la présentation antigénique est partagé par un autre inhibiteur de l'assemblage du splicéosome, la madrasine. En collaboration avec l'équipe CoSMIT (Université Paris Saclay), nous avons exploré l'espace chimique de la madrasine et défini une relation structure-activité. Cette démarche nous a finalement conduit à une famille de composés multi-cibles qui montrent des propriétés antiprolifératives, antivasculaires et immunomodulatrices. Nous disposons à présent d'une banque de composés à fort potentiel antitumoral, accessibles par voie de synthèse. Nous étudions l'effet de ces composés immunomodulateurs sur l'immunopeptidome du CMH-I. En effet, la modulation par ces

molécules chimiques du répertoire des antigènes présentés à la surface d'une cellule tumorale permet d'élargir le spectre des néoantigènes tumoraux pouvant être ciblés dans le contexte d'un vaccin thérapeutique. Nous nous intéressons en particulier aux néoantigènes mutés ou anormalement exprimés qui dérivent des séquences présumées non-codantes du génome. A l'heure actuelle, les vaccins ciblant des néoantigènes sont adaptés pour des tumeurs avec une forte charge mutationnelle. Les composés immunomodulateurs de la voie de présentation antigénique par le CMH-I sont potentiellement une nouvelle source de néoantigènes dans des modèles tumoraux faiblement mutés.

Les techniques que nous avons développées peuvent s'inscrire dans une démarche de médecine personnalisée. Une plateforme « *in vitro* » (*in situ* et *in vitro*), basée sur la co-culture des cellules tumorales et des cellules immunitaires isolées à partir d'une biopsie de patient, permettrait de cribler des banques de molécules et de sélectionner les composés immunomodulateurs induisant une prolifération de cellules T avec un profil effecteur cytotoxique ou mémoire. Nous pouvons envisager que les différentes familles de composés que nous avons déjà identifiées montrent des activités différentes en fonction du type de cancer et que cette plateforme *in vitro* nous permette de choisir le traitement le plus adapté pour chaque tumeur. Par ailleurs, nous pouvons étendre notre étude peptidomique basée sur la spectrométrie de masse à des échantillons humains afin de déterminer les néoantigènes présentés par la tumeur à sa surface. De manière importante, la base de données « All Frame » que nous avons générée et que nous continuons d'affiner nous permet d'identifier les antigènes produits par la traduction canonique des séquences codantes du génome mais également les antigènes cryptiques produits à partir des séquences présumées non-codantes et/ou par des événements de traduction non-canonique. Nous multiplions ainsi les sources possibles de néoantigènes exploitables. L'analyse « multiomique » (génomique, transcriptomique et peptidomique) de ces biopsies permettra enfin d'identifier les néoantigènes spécifiques de la tumeur, mutés ou anormalement exprimés, induits par les composés immunomodulateurs.

Les composés immunomodulateurs de la voie de présentation antigénique par le CMH-I ouvrent de nouvelles perspectives pour l'immunothérapie des cancers. Ces petites molécules peuvent s'inscrire dans des stratégies de combinaison de traitements visant à induire une réponse immunitaire forte, spécifique et durable dirigée contre les cellules tumorales.

# Matériels et méthodes

---

## I – Culture cellulaire et traitements

### 1. Maintenance des lignées cellulaires

La lignée de fibrosarcome murin **MCA205** a été cultivée à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du RPMI-1640 (Gibco) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM L-glutamine (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco), 1 mM pyruvate de sodium (Gibco) et 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco).

La lignée de mélanome murin **B16F10** a été cultivée à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du DMEM à 4,5 g/L D-Glucose, 2 mM L-glutamine et 1 mM pyruvate de sodium (Gibco) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% penicillin/streptomycin (Gibco).

Les cellules **B3Z**, hybridomes de cellules T CD8+, ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du RPMI-1640 (Gibco) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2mM L-glutamine (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco) et 50 µM 2-Mercaptoéthanol (Gibco).

Avant d'être ajouté aux milieux de culture, le SVF est décomplémenté par un chauffage à 56°C pendant 30 min. Le passage des cellules est réalisé lorsqu'elles sont à 80% de confluence, soit trois passages par semaine. Les cellules adhérentes MCA205 et B16F10 sont décollées avec de la trypsine à 0,05% EDTA (Gibco), pendant 5 min à 37°C. La trypsine est ensuite neutralisée par un ajout de quatre volumes de milieu complet préchauffé à 37°C. Les cellules sont ensuite réensemencées à une dilution de 1 :10. Les cellules semi-adhérentes B3Z sont décollées en tapotant légèrement le flacon de culture. Les cellules sont ensuite réensemencées à une dilution de 1 :10.

L'absence de mycoplasmes est vérifiée une fois par mois à l'aide du kit de détection VenorGeM OneStep Mycoplasma (BioValley) selon le protocole du fournisseur.

## 2. Transfection de plasmides

Le plasmide globin-SL8-intron contenant la séquence codant pour l'épitope SIINFEKL inséré dans le premier intron du gène de la  $\beta$ -globine et couplée à une protéine fluorescente jaune (YFP) a été précédemment décrit (Apcher et al., 2011).

Les MCA205 et les B161F10 sont ensemencées en plaques 6 puits à raison de  $1,8 \times 10^5$  cellules/puit et  $1,7 \times 10^5$  cellules/puit respectivement. Le lendemain, les MCA205 sont transfectées avec 1  $\mu$ g de plasmide globin-SL8-intron en utilisant le réactif jetPRIME (Polyplus-transfection) selon les recommandations du fabricant (ratio 2 :1 réactif jetPRIME : ADN). Les B16F10 sont transfectées avec 1  $\mu$ g de plasmide globin-SL8-intron en utilisant le réactif GeneJuice (Merck Millipore) selon le protocole du fournisseur (ratio 3 :1 réactif GeneJuice : ADN). L'efficacité de la transfection est évaluée par l'observation de la fluorescence de la YFP sur un microscope en épifluorescence Olympus IX73.

## 3. Traitements avec les drogues

L'isoginkgetine et la madrasin sont achetées chez Biopurify et Merck, respectivement. Avant solubilisation, les composés sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière. Les traitements sont réalisés après solubilisation des composés à 10 mM et 1,6 mM, respectivement, dans du DMSO. Après solubilisation, les composés sont conservés à -20°C. Les dérivés IP2 et M2P2 de l'isoginkgetine ainsi que les dérivés Madra.HCl, EYP59 et EYP201 de la madrasin sont synthétisés par l'équipe CoSMIT de la faculté de Pharmacie de Chatenay Malabry. Les dérivés sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière avant solubilisation puis à -20°C après solubilisation à 10 mM dans de l'eau pour procéder au traitement. Les composés sont utilisés aux concentrations précisées dans les différentes figures. La durée du traitement est, sauf mention contraire, de 18h.

## 4. Evaluation de la toxicité des composés par test MTT

Un test MTT est réalisé sur chaque lignée cellulaire et pour chaque drogue afin d'évaluer la toxicité des composés, d'estimer une  $IC_{50}$  et de sélectionner une concentration pour les tests

de présentation antigénique *in vitro*. Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits à raison de  $10^4$  cellules/puit dans 200  $\mu$ L de milieu. Le lendemain, les cellules sont traitées avec les différents composés. 18h après traitement, la plaque est centrifugée 5min à 1200 rpm puis 80% du surnageant est retiré. Le sel de tetrazolium MTT est resuspendu à 12,5 mg/mL dans du PBS puis ajouté sur les cellules à une concentration finale de 2,5 mg/mL. La plaque est incubée 2h à 37°C. La plaque est centrifugée 5min à 1200 rpm et la totalité du surnageant est délicatement retirée. Les cristaux de formazan de couleur violette sont resuspendus dans 200  $\mu$ L de DMSO. La densité optique à 550 nm mesurée sur un FLUOStar OPTIMA (BMG LABTECH) est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules.

## **5. Génération et culture des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs)**

Les cellules dendritiques de la moelle osseuse (BMDCs) ont été générées à partir de souris C57BL/6 âgées de 8 à 12 semaines. Les fémurs et tibias de chaque souris ont été prélevés et soigneusement nettoyés dans du RPMI-1640 pour retirer les muscles et autres tissus. Les os ont été lavés dans de l'éthanol à 70% puis les épiphyses ont été coupées et la moelle osseuse a été récupérée dans du RPMI-1640 à l'aide d'une seringue 1 mL surmontée d'une aiguille 26G. La suspension cellulaire est filtrée sur 70  $\mu$ m et sa concentration estimée sur lame de microscopie pour numération (Kova international). Les cellules de la moelle osseuse sontensemencées dans des boîtes de Pétri 100\*20mm à raison de  $5,0 \times 10^5$  cellules/mL (20 mL/boîte) dans du milieu IMDM (Sigma) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM L-glutamine (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco), 50  $\mu$ M 2-Mercaptoéthanol (Gibco), 10 ng/mL GM-CSF (StemCell) et 10 ng/mL IL-4 (StemCell). A J3, les cellules en suspension et les cellules faiblement adhérentes sont récoltées, comptées et ré-ensemencées à raison de  $5,0 \times 10^5$  cellules/mL (20 mL/boîte) dans du milieu IMDM complet. A J6, les BMDCs en suspension et faiblement adhérentes sont récoltées et utilisées dans les tests de présentation croisée ou les tests ELISpot IFN $\gamma$ .

## II – Test de présentation antigénique *in vitro*

### 1. Préparation des cellules tumorales avant co-culture

Le test de présentation antigénique *in vitro* se déroule sur cinq jours. Le premier jour, les cellules MCA205 et B16F10 sontensemencées en plaques 6 puits à raison de  $1,8 \times 10^5$  cellules/puit et  $1,7 \times 10^5$  cellules/puit respectivement. Le deuxième jour, les cellules sont transfectées tel que décrit dans la section *Transfection de plasmides* (I-2) précédente. Le troisième jour, les cellules sont traitées avec les différents composés, comme décrit dans la section *Traitement avec les drogues* (I-3) précédente.

### 2. Co-culture des cellules tumorales et des hybridomes B3Z

Le quatrième jour, les cellules tumorales MCA205 ou B16F10 sont récoltées puis lavées à trois reprises dans le milieu de culture des hybridomes B3Z (voir 1. Maintenance des lignées cellulaires). Les cellules sont finalement resuspendues dans 500  $\mu\text{L}$  de milieu de culture B3Z et leur concentration est estimée sur une lame de microscopie pour numération (Kova international) après dilution au  $10^{\circ}$  dans une solution au bleu de trypan, 0,4 % (Gibco). Les cellules tumorales sontensemencées dans une plaque 96 puits à raison de  $5,0 \times 10^4$  cellules/puit dans 50  $\mu\text{L}$  de milieu. Les hybridomes B3Z sont resuspendus dans leur milieu de culture, comptés sur lame de microscopie pour numération et  $1,0 \times 10^5$  cellules sont ajoutées dans 100  $\mu\text{L}$  de milieu sur les cellules tumorales (ratio 2 :1 hybridomes B3Z : cellules tumorales). Le volume est complété à 250  $\mu\text{L}$  avec 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture B3Z. Dans les puits concernés, le peptide SIINFEKL solubilisé dans du DMSO est ajouté à 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3. Révélation du test

Le cinquième jour, la plaque est centrifugée 5min à 1200 rpm puis les cellules sont lavées deux fois dans 200  $\mu\text{L}$  PBS. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 50  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse contenant 0,2% TritonX-100 (Sigma), 10 mM DL-Dithiothreitol (Sigma), 90 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 8,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma). La plaque est incubée 5min sous agitation à température

ambiante. Après 10min de centrifugation à 3000 rpm, le surnageant est transféré dans une plaque 96 puits blanche et opaque (OptiPlaque-96, PerkinElmer). Un volume de 100  $\mu$ L de tampon de révélation composé de 10 mM  $MgCl_2$  (Sigma), 11,2 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma), 0,0015% IGEPAL® CA-630 (Sigma) et 40  $\mu$ M 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-Galactopyranoside (MUG) (Sigma) dans du PBS est ajouté dans chaque puit pour une incubation d'au moins 3h à l'abri de la lumière. L'activité  $\beta$ -galactosidase des cellules B3Z est mesurée en fluorescence sur un FLUOStar OPTIMA (BMG LABTECH). Le filtre d'excitation est programmé à 355 nm, celui d'émission à 460 nm. Les données sont présentées en MEAN  $\pm$  SEM. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , test de Student)

### **III – Cytométrie en flux**

Les acquisitions de cytométrie en flux sont réalisées sur un FACS Canto II (BD Pharmingen). Les données sont ensuite traitées avec le logiciel FlowJow (V10). Dans cette section, le tampon PEB est un tampon PBS pH 7,2 contenant 0,5% BSA et 2 mM EDTA.

#### **1. Etude de l'apoptose induite par IP2**

Les cellules MCA205 et B16F10 sontensemencées dans des boîtes de Petri 100\*20mm à raison de  $1,0 \times 10^6$  cellules/boîte dans 10 mL de milieu. Le lendemain, les cellules sont traitées avec IP2 à 35  $\mu$ M et 1000  $\mu$ M. 18h après traitement, les cellules sont récoltées dans la trypsine à 0,05% EDTA, lavées dans le PBS puis comptées et resuspendues à  $10^6$  cellules/mL dans du Tampon de Liaison Annexin V 1X (BD Pharmingen) selon le protocole du fournisseur.  $10^6$  cellules sont marquées avec 5  $\mu$ L APC-Annexin V et du DAPI (BioLegend) dilué au 1000<sup>e</sup> pendant 15 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées à deux reprises puis resuspendues dans 400  $\mu$ L de Tampon de Liaison Annexin V 1X avant de procéder à l'acquisition

#### **2. Cinétique de retour des molécules H-2K<sup>b</sup> à la surface cellulaire**

Les cellules MCA205 sontensemencées dans des boîtes de Petri 100\*20mm à raison de

1,5x10<sup>6</sup> cellules/boîte. Le lendemain, les cellules sont traitées avec l'isoginketine à 25 µM, IP2 à 35 µM ou M2P2 à 35 µM. Après 18h d'incubation, les cellules sont récoltées dans la trypsine à 0,05% EDTA, lavées dans le PBS puis resuspendues à 10x10<sup>6</sup> cellules/mL dans un Tampon de Décapage glacé composé de 0,13M acide citrique, 0,061M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,15M NaCl dont le pH est ajusté à 3. Les cellules sont incubées dans ce tampon pendant 2min puis lavées trois fois avec du PBS et resuspendues dans du milieu de culture pré-chauffé à raison de 10x10<sup>6</sup> cellules/mL. Le peptide SIINFEKL est ajouté dans le milieu de culture à raison de 4 µg/mL. Aux temps indiqués, un échantillon de 1,5x10<sup>6</sup> cellules est prélevé, lavé et marqué avec un PE-anti H-2K<sup>b</sup> (AF6-88.5, BioLegend) ou un PE-anti SIINFEKL lié au H-2K<sup>b</sup> (25-D1.16, BioLegend) dilués au 100<sup>e</sup> ainsi que du DAPI (BioLegend) dilué au 1000<sup>e</sup> pendant 25min à 4°C. Les cellules sont lavées à deux reprises dans du tampon PEB avant de procéder à l'acquisition.

### **3. Analyse de la population T CD8<sup>+</sup> spécifique du SIINFEKL**

Trois jours après le transfert adoptif de cellules T CD8<sup>+</sup> OT-1 (voir 4. Transfert adoptif de cellules T CD8<sup>+</sup> OT-1) dans des souris C57BL/6, les rates sont prélevées et broyées sur 70 µm dans du RPMI-1640 (Gibco). La suspension cellulaire est filtrée sur 70 µm puis les globules rouges sont lysés dans un tampon ACK (Ammonium-Chloride-Potassium). Les cellules sont resuspendues dans un tampon PBS contenant 2 mM EDTA et 0,5% BSA et comptées à l'aide d'un Vi-CELL XR (Beckman). Un échantillon de 2,0x10<sup>6</sup> cellules est prélevé et resuspendu dans 50 µL tampon PEB auxquels sont ajoutés 10 µL d'un dextramère H-2K<sup>b</sup>/SIINFEKL couplé à l'APC (Immudex). Les cellules sont conservées 10min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'anticorps VioBright FITC-anti CD8a (REA601, Miltenyi) dilué au 100<sup>e</sup> et le marqueur de viabilité LIVE/DEAD Yellow (ThermoFisher) dilué au 1000<sup>e</sup> sont ajoutés dans 50 µL de tampon PEB puis les cellules sont conservées 25 min à 4°C. Les cellules sont lavées à deux reprises dans du tampon PEB avant de procéder à l'acquisition.

## IV – Séquençage de l'ARN (RNA-seq)

### 1. Analyse différentielle de l'expression de gènes

Les cellules MCA205 et B16F10 sont traitées avec l'isoginkgetine à 15  $\mu\text{M}$  ou IP2 à 35  $\mu\text{M}$ . Après 18h d'incubation, les cellules sont récoltées et l'ARN est extrait à l'aide du kit RNeasy (Qiagen). Les bibliothèques de séquençage sont construites à partir des ARNs polyadénylés capturés à l'aide de billes magnétiques oligo(dT) selon le protocole du fournisseur (Life Technologies). Les bibliothèques sont générées de manière directionnelle sur le premier brin par la méthode du dUTP et séquencées sur un Illumina HiSeq4000 en mode « paired-end » 2\*50bp. Les données de RNA-seq sont ensuite alignées sur le génome murin mm10 à l'aide de TopHat2 (version 2.1.1) avec les paramètres par défaut et du programme CuffDiff (version 2.2.1) pour l'analyse différentielle d'expression de gènes. Le programme CuffDiff est utilisé avec les paramètres suivants : `--library-type=fr-firststrand --compatible-hits-norm --library-norm-method geometric --min-reps-for-js-test 2 --dispersion-method per-condition -u -b`. La différence d'expression d'un gène entre deux échantillons est considérée significative quand la valeur q est inférieure à 0,05 (par défaut) et la variation relative (« fold change ») supérieure à 2. Les diagrammes de dispersion ont été réalisés avec la bibliothèque ggplot2 sur R.

### 2. Construction des bases de données « Retained Introns »

Les bibliothèques pour la construction des bases de données pour l'analyse protéomique ont été générées à partir du kit TruSeq Stranded Total RNASample (Illumina) selon le protocole du fournisseur. Les bibliothèques sont ensuite séquencées sur un Illumina HiSeq4000 en mode « paired-end » 2\*75bp. Les bases de données *Retained Introns MCA205* et *Retained Introns B16F10* sont générées à partir de quatre répliquats par lignée cellulaire avec l'outil « keep me around » (kma). Les étapes sont les suivantes : (i) Pré-traitement : génération des coordonnées des introns à partir du génome de référence (GENCODE release GRCm38) et du fichier d'annotation (GTF file), (ii) Quantification : alignement des données de RNA-seq sur les introns et les transcrits précédemment identifiés à l'aide du progiciel Bowtie2 (version 2.3.3.1) et quantification avec l'outil eXpress, (iii) Post-traitement : application de l'outil kma et génération d'une liste d'introns retenus. Chaque séquence nucléique intronique est ensuite

traduite dans les trois cadres de lecture. Les séquences d'acides aminés résultantes sont coupées au niveau des codons stop et les séquences dont la longueur est inférieure à huit acides aminés sont éliminées.

## **V – Analyse de l'immunopeptidome du CMH-I**

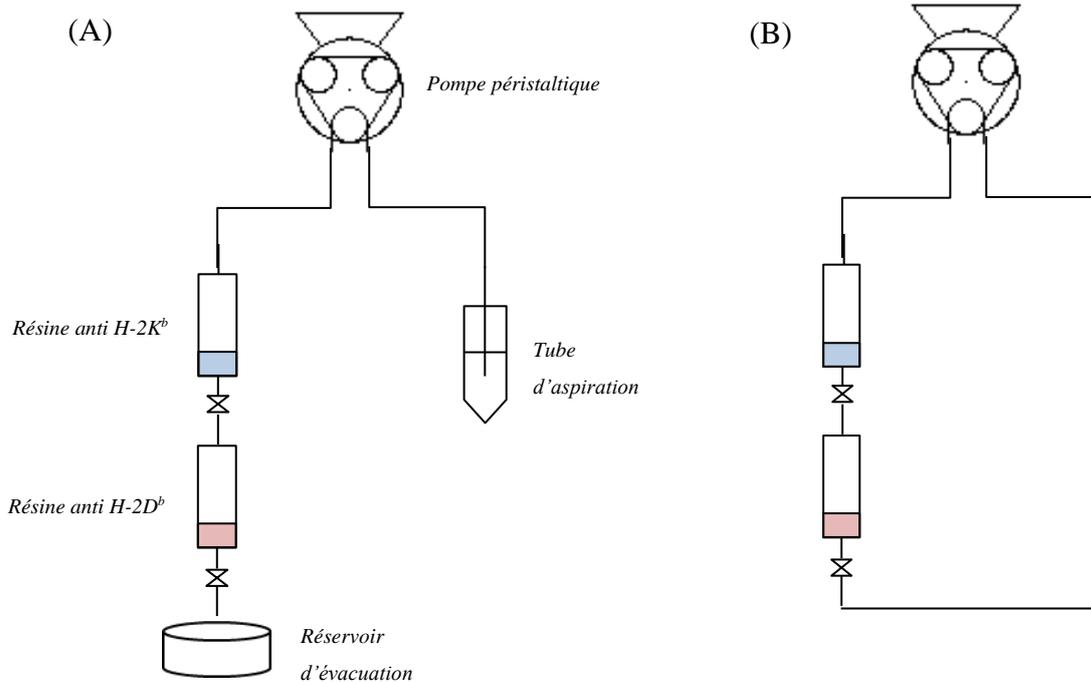
### **1. Préparation des colonnes d'affinité**

Les colonnes d'affinité sont préparées en couplant séparément un anticorps anti H-2K<sup>b</sup> (clone Y-3) et un anticorps anti H-2D<sup>b</sup> (clone B22-249) à une matrice de sépharose activée par bromure de cyanogène 4B (GE Healthcare). Les anticorps ont été gracieusement fournis par le Prof. Dr. Stefan Stevanovic (Université de Tübingen). Pour préparer une colonne, 40 mg de résine CNBr-Sepharose sont activés dans 1 mM HCl pendant 30min sur un agitateur à rouleaux, à température ambiante. La résine est ensuite centrifugée puis resuspendue dans un Tampon de Couplage contenant 0,5M NaCl et 0,1M NaHCO<sub>3</sub> auquel on ajoute 1 mg d'anticorps. Après 2h d'incubation sur un agitateur à rouleaux à température ambiante, la résine est centrifugée et resuspendue dans un Tampon de Blocage contenant 0,2M glycine dans du PBS. Après 1h d'incubation sur un agitateur à rouleaux à température ambiante, la résine est centrifugée, lavée deux fois dans du PBS et finalement resuspendue dans du PBS à raison de 1 mg d'anticorps/mL. Un stock est préparé et conservé à 4°C. Il est utilisé dans les deux mois suivant la préparation.

### **2. Elution des peptides présentés dans les molécules du CMH-I**

Les cellules MCA205 et B16F10 sontensemencées dans des boîtes de Petri 145\*20mm à raison de  $2,0 \times 10^6$  cellules/boîte dans 20 mL de milieu. Le lendemain les cellules sont traitées avec IP2 35  $\mu$ M. Après 18h d'incubation, les cellules sont récoltées avec l'enzyme TrypLE™ Express (Gibco), lavées et comptées. Un nombre total de  $400 \pm 50 \cdot 10^6$  cellules est resuspendu dans un Tampon de Solubilisation contenant 0,25 % désoxycholate de sodium (MP Biomedicals) et deux tablettes d'inhibiteurs de protéases (Thermo Fisher) et placées à 4°C sous agitation pendant 1h. Le lysat est ensuite soniqué sur glace puis replacé sous agitation à

4°C pendant 1h. Le lysat est centrifugé à 3800xg pendant 1h à 4°C puis le surnageant est prélevé, filtré sur 0,40µm et aspiré dans le système schématisé ci-après contenant les colonnes d'affinité décrites précédemment (voir 1. Préparation des colonnes d'affinité). L'élution se déroule à 4°C en boucle fermée sur une nuit.



**Figure 53: Schéma du montage pour l'immunoprécipitation des peptides du CMH-I.**

(A) Etat du système pendant les étapes d'aspiration et de rinçage.

(B) Etat du système pendant l'immunoprécipitation en boucle fermée.

Le lendemain, les matrices de sépharose sont lavées avec du PBS pendant 1h, puis avec de l'eau pendant 1h, avant d'être complètement séchées. Un volume de 100 µL de 0,2% TFA est ajouté sur les matrices qui sont ensuite agitées pendant 25min à 4°C. L'éluat est récolté en appliquant une pression sur le haut de la matrice à l'aide d'une seringue. L'opération est répétée trois fois soit un total de quatre éluations. Les quatre éluats sont combinés et centrifugés 5min à 13000 rpm. Le surnageant est transféré sur un filtre Nanosep® avec membrane Omega™ de 3 kD (Pall Laboratory) préalablement rincé avec, dans l'ordre, de l'eau, 0,1N NaOH, de l'eau et 0,2% TFA. Le filtre est ensuite rincé avec une solution 32,5% ACN et 0,2% TFA. Le filtrat est concentré à l'aide d'un évaporateur (Speed Vac, DJB Labcare) et conservé à -80°C.

## 4. Caractérisation par LC-MS/MS

Les peptides sont dessalés à l'aide de pointes de pipette ZipTip C<sup>18</sup> (Pierce Thermo Scientific), élués dans 40 µL 70% acétonitrile/0,1% acide formique et centrifugés sous vide avant d'être resuspendus dans 12 µL 0,1% acide formique. L'acquisition est effectuée sur un Orbitrap Fusion Tribrid équipé d'un ionisateur par électronébuliseur (ESI) EASY-Spray couplé à un système EASY Nano-LC Proxeon 1200 (Thermo Fisher Scientific). La séparation des peptides a été réalisée avec les paramètres suivants : pré-colonne C18 Acclaim PepMap100 (2 cm, 75 µm i.d., 3 µm, 100 Å), colonne C18 Pepmap-RSLC Proxeon (75 cm, 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å), débit de 300 nl/min, gradient de 95 % solvant A (eau, 0,1% acide formique) à 28% solvant B (80% acétonitrile, 0,1% acide formique) pendant 105 min puis 40% solvant B pendant 15 min suivi par 50 min de régénération de la colonne C18. Les peptides ont été analysés dans l'Orbitrap en mode « Full Scan » à une résolution de 120000 et une gamme de rapports m/z entre 400 et 650 sur un analyseur de type quadripole avec un nombre d'ions maximal (« AGC target ») de  $1,5 \times 10^5$ . Les fragments ont été obtenus par dissociation induite par collision (CID) avec une énergie de collision de 35%. Les données de MS/MS ont été acquises en mode « Top Speed » avec un cycle total de 3 sec et un nombre d'ions maximal de  $7 \times 10^4$ . Le temps maximal d'accumulation des ions est fixé à 100 ms pour la phase MS et à 150 ms pour l'acquisition MS/MS en mode parallèle. Les données de MS/MS sont traitées sur le logiciel Sequest en utilisant Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific) pour l'analyse quantitative. La tolérance de masse est fixée à 10 ppm pour les précurseurs et à 0,02 Da pour les fragments. L'oxydation est ajoutée comme modification variable. Aucune enzyme n'est spécifiée. Les peptides sont filtrés avec un taux de faux positifs de 5% (FDR 5%). Les données de MS/MS sont croisées avec la base de données Uniprot et les bases de données *Retained Introns MCA205* et *Retained Introns B16F10* construites en interne (voir 2. Construction des bases de données « Retained Introns »).

## 5. Analyse quantitative « sans étiquette »

L'analyse quantitative sans étiquette est réalisée à partir des données brutes en utilisant le logiciel Progenesis-Qi 4.1 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K.) en suivant les étapes suivantes : (i) alignements des chromatogrammes, (ii) normalisation des abondances de peptides, (iii) analyses statistiques des composantes et (iv) identification des peptides en

utilisant le serveur Sequest sur Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific). La tolérance de masse est fixée à 10 ppm pour les précurseurs et à 0,02 Da pour les fragments. L'oxydation est ajoutée comme modification variable. Aucune enzyme n'est spécifiée. Les peptides sont filtrés avec un taux de faux positifs de 5% (FDR 5%). Les données de MS/MS sont croisées avec la base de données Uniprot et les bases de données *Retained Introns MCA205* et *Retained Introns B16F10* construites en interne (voir 2. Construction des bases de données « Retained Introns »). Les fichiers de résultats sont importés sur Progenesis LC.

## 6. Disponibilité des données

L'ensemble des données de protéomique est disponible sur le référentiel PRIDE partner sous l'identifiant PXD012102.

## VI – Tests ELISpot et ELISA

### 1. ELISpot IFN $\gamma$

La sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est évaluée avec le Mouse IFN $\gamma$  ELISPOT Kit (Cell Sciences) selon le protocole du fournisseur. Au préalable, des souris C57BL/6 sont immunisées avec les différents peptides, en groupe ou individuellement, tel que décrit par la suite dans la section 5. Immunisation avant ELISpot IFN $\gamma$ . Sept jours après immunisation, les rates sont prélevées et broyées sur 70  $\mu$ m dans du RPMI sans SVF. La suspension cellulaire est filtrée sur 70  $\mu$ m puis les globules rouges sont lysés dans un tampon ACK (Ammonium-Chloride-Potassium). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont isolés par sélection magnétique positive en utilisant les billes CD8a (Ly-2) (Miltenyi) sur un autoMACS Pro Separator (Miltenyi) selon le protocole du fournisseur. Après tri, 2,0x10<sup>5</sup> cellules T CD8<sup>+</sup> sont ajoutées sur 1,0x10<sup>5</sup> BMDCs (voir 5. Génération et culture des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) préalablement incubées pendant 6h avec 30  $\mu$ g/mL de peptides (individuel ou en groupe) dans la plaque 96 puits à fonds plats pour ELISpot. Au final, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les BMDCs activées sont co-cultivés dans la plaque 96 puits à fond plat pour ELISpot dans 200  $\mu$ L de RPMI complet sans SVF pendant 18h.

## 2. ELISA IL-2

La sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est évaluée avec le kit ELISA MAX™ Standard Set Mouse IL-2 (BioLegend) selon le protocole du fournisseur. On dose l'IL-2 dans les surnageants de la co-culture entre les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les BMDCs activées dans la plaque 96 puits à fonds plats pour ELISpot.

## VII – Expérimentation animale

Pour l'ensemble des expériences *in vivo*, des souris C57BL/6 femelles âgées de 6 semaines sont commandées chez le fournisseur Harlan. Les souris sont hébergées au sein de la Plateforme d'Evaluation Préclinique de Gustave Roussy. Tous les travaux sont réalisés dans le respect de la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement), et ils sont officiellement autorisés et validés par le comité d'éthique n°26, qui est officiellement agréé par le Ministère de la Recherche, le tout en conformité avec la Directive Européenne 2010/63 UE et sa transposition en droit français.

### 1. Suivi de croissance tumorale après traitement

Pour induire la formation de tumeurs, les cellules de sarcomes sont injectées en sous-cutané dans le flanc droit de la souris dans 100 µL PBS à raison de  $1,5 \cdot 10^5$  cellules/souris pour les MCA205 WT et  $2,0 \cdot 10^5$  cellules/souris pour les MCA205 globin-SL8-intron. Les cellules de mélanomes B16F10 WT sont injectées en sous-cutané dans le flanc droit dans un mélange 50:50 PBS : Matrigel® (Corning Life Science) afin de réduire la formation de métastases létales à raison de  $5,0 \cdot 10^4$  cellules/souris. En fonction des études, le traitement débute sur tumeurs mesurables mais dites « non-établies » (10-15mm<sup>2</sup>) ou sur tumeurs dites « établies » (20-25mm<sup>2</sup>). Généralement cette taille est atteinte sept jours après inoculation des cellules tumorales. Les composés sont alors injectés en intra-péritonéal (sauf mention contraire) aux doses indiquées, à raison de deux à trois injections par semaine. La taille de la tumeur est mesurée trois fois par semaine et exprimée en aire (mm<sup>2</sup>). Les souris sont sacrifiées quand leur tumeur atteint 300 mm<sup>2</sup> ou plus tôt si des signes de souffrance sont observés. Les données sont présentées en MEAN ±SEM (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ANOVA suivie d'un test

de comparaison multiples de Dunnet).

## 2. Déplétion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Pour évaluer l'implication des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans l'activité antitumorale d'IP2, nous avons neutralisé cette population *in vivo* à l'aide d'un anticorps monoclonal. Chaque souris a reçu l'anticorps anti CD8 (53-6.7, BioXCell) à raison d'une injection de 200 µg dans 100 µL PBS tous les trois jours pendant toute la durée de l'expérience. Les souris du groupe contrôle ont reçu l'isotype IgG2a de rat (2A3, BioXCell) à raison d'une injection de 200 µg dans 100 µL PBS tous les trois jours pendant toute la durée de l'expérience. La taille de la tumeur est mesurée trois fois par semaine et exprimée en aire (mm<sup>2</sup>). Les souris sont sacrifiées quand leur tumeur atteint 300 mm<sup>2</sup> ou plus tôt si des signes de souffrance sont observés. Les données sont présentées en MEAN ±SEM (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ANOVA suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey).

## 3. Réponse mémoire antitumorale

Les souris ayant connu une régression complète de leur tumeur après traitement avec un composé (voir 1. Suivi de croissance tumorale après traitement) sont conservées pour évaluer l'établissement d'une réponse mémoire antitumorale. Environ trois mois après la première inoculation de sarcomes MCA205 dans le flanc droit, les souris reçoivent une seconde injection des mêmes sarcomes MCA205 dans le flanc droit ainsi qu'une injection de mélanomes B16F10 dans le flanc gauche à raison de 1,5x10<sup>5</sup> cellules/souris et 1,0x10<sup>4</sup> cellules/souris, respectivement. La taille de chaque tumeur est mesurée trois fois par semaine et exprimée en aire (mm<sup>2</sup>). Les souris sont sacrifiées quand une de leur tumeur atteint 300 mm<sup>2</sup> ou plus tôt si des signes de souffrance sont observés. Les données sont présentées en MEAN ±SEM (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ANOVA suivie d'un test de comparaison multiples de Dunnet).

## 4. Transfert adoptif de cellules T CD8<sup>+</sup> OT-1

Les cellules T des souris OT-1 expriment un récepteur de lymphocyte T spécifique du peptide SIINFEKL de l'ovalbumine (OVA) présenté dans une molécule H-2K<sup>b</sup>. Les souris OT-1

proviennent d'un élevage interne. Les rates de souris âgées de 8 à 12 semaines sont prélevées et broyées sur un filtre 70 µm dans du RPMI-1640 (Gibco). La suspension cellulaire est filtrée sur un filtre 70 µm puis les globules rouges sont lysés dans un tampon ACK (Ammonium-Chloride-Potassium). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont isolés par sélection magnétique positive en utilisant les billes CD8a (Ly-2) (Miltenyi) sur un autoMACS Pro Separator (Miltenyi) selon le protocole du fournisseur. Les cellules sont ensuite comptées et resuspendues à 30.10<sup>6</sup> cellules/mL dans du PBS. 3,0.10<sup>6</sup> cellules sont alors injectées dans la veine caudale de souris C57BL/6 porteuses d'une tumeur MCA205 globin-SL8-intron établie et préalablement traitées avec IP2 à 24 mg/kg. Les données sont présentées en MEAN ±SEM (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ANOVA suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey).

## 5. Immunisation avant ELISpot IFN<sub>γ</sub>

Après réception, les peptides (GL Biochem) sont resuspendus à 5 µg/µL dans du PBS, aliquotés et conservés à -20°C. Les oligonucléotides CpG ODN1668 (Invivogen) sont resuspendus à 500 µM dans de l'eau. Les souris sont immunisées avec les peptides individuels ou inclus dans un groupe de trois peptides. Chaque souris reçoit une quantité totale de 100 µg peptides et 30 µg CpG en sous-cutané à la base de la queue. Le tableau ci-après est donné en exemple pour détailler la préparation des solutions injectables du groupe 2 contenant les peptides MCA205 KB-12, KB-15 et KB-16.

**Tableau 9: Exemple de préparation des solutions injectables pour l'immunisation.**

GR	2	2_1	2_2	2_3	CTRL
<b>KB-12 (5µg/µL)</b>	6,7 µL	20 µL	-	-	-
<b>KB-15 (5µg/µL)</b>	6,7 µL	-	20 µL	-	-
<b>KB-16 (5µg/µL)</b>	6,7 µL	-	-	20 µL	-
<b>ODN 1668</b>	9,5 µL				
<b>PBS</b>	50,4 µL	70,5 µL	70,5 µL	70,5 µL	90,5 µL

## **6. Combinaison drogue/peptide – Vaccination prophylactique**

Les peptides pour lesquels une population de lymphocytes CD8<sup>+</sup> réactive a été identifiée par ELISpot IFN $\gamma$  et ELISA IL-2 sont sélectionnés pour une vaccination prophylactique où le peptide est utilisé en combinaison avec la molécule IP2. Les souris reçoivent deux injections de 100  $\mu$ g de peptide et 30  $\mu$ g CpG en sous-cutané à la base de la queue à deux semaines d'intervalle (J-21 et J-7). Sept jours après la seconde injection, les souris reçoivent  $1,5 \times 10^5$  MCA205 WT ou  $5,0 \times 10^4$  B16F10 WT en sous-cutané sur le flanc droit (J0). Avant que les tumeurs ne s'établissent, les souris sont traitées avec IP2 à 24 mg/kg (MCA205) ou 36 mg/kg (B16F10) en intra-péritonéal à raison de deux injections par semaine (J4, J7, J10, J14 et J17). La taille de la tumeur est mesurée trois fois par semaine et exprimée en aire (mm<sup>2</sup>). Les souris sont sacrifiées quand leur tumeur atteint 300 mm<sup>2</sup> ou plus tôt si des signes de souffrance sont observés. Les données sont présentées en MEAN  $\pm$ SEM (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ANOVA suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey).

## **7. Combinaison drogue/peptide – Vaccination thérapeutique**

Les peptides pour lesquels une population de lymphocytes CD8<sup>+</sup> réactive a été identifiée par ELISpot IFN $\gamma$  et ELISA IL-2 sont sélectionnés pour une vaccination thérapeutique où le peptide est utilisé en combinaison avec la molécule IP2. Les souris reçoivent  $1,5 \times 10^5$  MCA205 WT ou  $5,0 \times 10^4$  B16F10 WT en sous-cutané sur le flanc droit (J0). Quand la taille des tumeurs atteint environ 25 mm<sup>2</sup> les souris sont traitées avec IP2 à 24 mg/kg (MCA205) ou 36 mg/kg (B16F10) en intra-péritonéal à raison de deux injections par semaine pendant deux semaines (J7, J10, J14 et J17). En parallèle, les souris reçoivent 100  $\mu$ g de peptide et 30  $\mu$ g CpG en sous-cutané à la base de la queue, une première fois à J8 et une seconde fois à J15. La taille de la tumeur est mesurée trois fois par semaine et exprimée en aire (mm<sup>2</sup>). Les souris sont sacrifiées quand leur tumeur atteint 300 mm<sup>2</sup> ou plus tôt si des signes de souffrance sont observés. Les données sont présentées en MEAN  $\pm$ SEM (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ANOVA suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey).

## 8. Combinaison vaccin thérapeutique/anti-PD-1

Les souris reçoivent  $1,5 \times 10^5$  MCA205 WT ou  $5,0 \times 10^4$  B16F10 WT en sous-cutané sur le flanc droit (J0). Quand les tumeurs sont établies (environ  $25 \text{ mm}^2$ ), les souris sont traitées de manière concomitante avec IP2 à 24 mg/kg (MCA205) ou 36 mg/kg (B16F10) en intra-péritonéal et l'anticorps anti-PD-1 (RMP1-14, BioXCell) à 10 mg/kg en intra-péritonéal à raison d'une injection tous les trois jours pendant toute la durée de l'expérience (J4, J7, J10 et J14). Les souris du groupe contrôle ont reçu l'isotype IgG2a de rat (2A3, BioXCell) à 10 mg/kg en intra-péritonéal à raison d'une injection tous les trois jours pendant toute la durée de l'expérience (J4, J7, J10 et J14). Dans le cadre de la triple combinaison IP2/KB-1/anti-PD-1, les souris reçoivent  $1,5 \times 10^5$  MCA205 WT en sous-cutané sur le flanc droit (J0). Quand les tumeurs sont établies, les souris sont vaccinées avec 100  $\mu\text{g}$  du SLP KB-1 et 30  $\mu\text{g}$  de CpG injectés en sous-cutané à la base de la queue (J8) et traitées en parallèle avec IP2 à 24 mg/kg en intra-péritonéal (J7 et J10). A J15, les souris reçoivent une deuxième injection du vaccin composé de 100  $\mu\text{g}$  du SLP KB-1 et 30  $\mu\text{g}$  de CpG injectés en sous-cutané à la base de la queue et le traitement avec l'anti-PD-1 est initié à raison d'une injection à 10 mg/kg en intra-péritonéal tous les trois jours pendant toute la durée de l'expérience (J15, J18, J21 et J24). Le traitement avec IP2 se poursuit également à raison de deux injections à 24 mg/kg par semaine en intra-péritonéal (J14, J17, J21 et J24). Les souris sont sacrifiées quand leur tumeur atteint  $300 \text{ mm}^2$  ou plus tôt si des signes de souffrance sont observés. Les données sont présentées en MEAN  $\pm$ SEM (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA suivie d'un test de comparaison multiples de Tukey).

## Publications et communications

---

### I – Publications

**Darrigrand, R.\***, Pierson, A.\*, Rouillon, M., Boulpicante, M., Renko, D., Garcia, C., Ghosh, M., Laiguillon, M.-C., Lobry, C., Alami, M., Apcher, S. Isoginkgetin derivative IP2 enhances the adaptive immune response to tumor antigens. *En cours de rédaction*

\* = co-premiers auteurs

Boulpicante, M., **Darrigrand, R.**, Pierson, A., Salgues, V., Rouillon, M., Gaudineau, B., Khaled, M., Cattaneo, A., Bachi, A., Cascio, P., et al. (2020). Tumors escape immunosurveillance by overexpressing the proteasome activator PSME3. *OncoImmunology* 9, 1761205.

Alami M., Provot, O., Hamze, A., Khelifi, I., Naret, T., Apcher, S., **Darrigrand, R.**, 2019. Composés à activité inhibitrice de la polymérisation de la tubuline et aux propriétés immunomodulatrices. WO2019207257.

Apcher, S., Pierson A., Boulpicante, M., Renko, D., Alami, M., **Darrigrand, R.**, 2018. Composés, composition et leurs utilisations dans le traitement du cancer. WO2018189210.

Apcher, S., Alami, M., Messaoudi, S., **Darrigrand, R.**, Salgues, V., Renko, D., Yen-Pon, E., 2018. Madrasin-derivative compounds, composition and uses thereof for treating cancer. EP18406499.7.

Naret, T., Bignon, J., Bernadat, G., Benchekroun, M., Levaique, H., Lenoir, C., Dubois, J., Pruvost, A., Saller, F., Borgel, D., Manoury, B., Leblais, V., **Darrigrand, R.**, Apcher, S., Brion, J.-D., Schmitt, E., Leroux, F.R., Alami, M., Hamze, A., 2018. A fluorine scan of a tubulin polymerization inhibitor isocombretastatin A-4: Design, synthesis, molecular modelling, and biological evaluation. *Eur J Med Chem* 143, 473–490.

## II – Communications

Darrigrand R., *Therapeutic cancer vaccines*. **UE 6 Immunothérapie des Cancers, M2 Immunologie, 3 décembre 2019, Faculté de Médecine du Kremlin-Bicêtre.** (Cours)

Darrigrand R., Pierson A., Dolor R.Z., Alami M. and Apcher S. *Immunomodulators of the MHC-I antigen presentation pathway with anti-tumor activity*. **5<sup>th</sup> CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference, 25-28 septembre 2019, Paris.** (Poster)

Darrigrand R., Pierson A., Dolor R.Z., Alami M. and Apcher S. *Immunomodulators of the MHC-I antigen presentation pathway with anti-tumor activity*. **15<sup>èmes</sup> Journées de l'Ecole Doctorale de Cancérologie, 27-29 mai 2019, Station Biologique de Roscoff.** (Oral)

Darrigrand R., Pierson A., Dolor R.Z., Alami M. and Apcher S. *Immunomodulators of the MHC-I antigen presentation pathway with anti-tumor activity*. **14<sup>èmes</sup> Journées de l'Ecole Doctorale de Cancérologie, 22-24 mai 2018, Station Biologique de Roscoff.** (Poster)

Darrigrand R., Pierson A., Dolor R.Z., Alami M. and Apcher S. *The spliceosome is a druggable target for epitope-based immunotherapies*. **International Symposium “Drug Discovery and New Therapeutics”, 9-11 avril 2018, Orsay.** (Oral)

Darrigrand R., *Therapeutic cancer vaccines*. **UE 6 Immunothérapie des Cancers, M2 Immunologie, 6 décembre 2017, Faculté de Médecine du Kremlin-Bicêtre.** (Cours)

## Bibliographie

---

- Abe, F., Dafferner, A.J., Donkor, M., Westphal, S.N., Scholar, E.M., Solheim, J.C., Singh, R.K., Hoke, T.A., and Talmadge, J.E. (2010). Myeloid-derived suppressor cells in mammary tumor progression in FVB Neu transgenic mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 47–62.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* 8, 765–772.
- Ahmadzadeh, M., Pasetto, A., Jia, L., Deniger, D.C., Stevanović, S., Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A. (2019). Tumor-infiltrating human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity. *Sci Immunol* 4.
- Ahmed, S., Sami, A., and Xiang, J. (2015). HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer* 22, 101–116.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499–511.
- Alegre, M.L., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 220–228.
- Aleksic, M., Liddy, N., Molloy, P.E., Pumphrey, N., Vuidepot, A., Chang, K.-M., and Jakobsen, B.K. (2012). Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: implications for therapeutic strategies. *Eur. J. Immunol.* 42, 3174–3179.
- Allaire, P.D., Marat, A.L., Dall'Armi, C., Di Paolo, G., McPherson, P.S., and Ritter, B. (2010). The Connecdenn DENN domain: a GEF for Rab35 mediating cargo-specific exit from early endosomes. *Mol. Cell* 37, 370–382.
- Anagnostou, V., Smith, K.N., Forde, P.M., Niknafs, N., Bhattacharya, R., White, J., Zhang, T., Adleff, V., Phallen, J., Wali, N., et al. (2017). Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov* 7, 264–276.
- Anani, W., and Shurin, M.R. (2017). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1036, 105–128.
- Anderson, A.C., Joller, N., and Kuchroo, V.K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 44, 989–1004.

- Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitzer, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., et al. (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *33*, 2780–2788.
- Angell, H., and Galon, J. (2013). From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Current Opinion in Immunology* *25*, 261–267.
- Ankri, C., Shamalov, K., Horovitz-Fried, M., Mauer, S., and Cohen, C.J. (2013). Human T cells engineered to express a programmed death 1/28 costimulatory retargeting molecule display enhanced antitumor activity. *J. Immunol.* *191*, 4121–4129.
- Antón, L.C., and Yewdell, J.W. (2014). Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. *J. Leukoc. Biol.* *95*, 551–562.
- Antón, L.C., Schubert, U., Bacík, I., Princiotta, M.F., Wearsch, P.A., Gibbs, J., Day, P.M., Realini, C., Rechsteiner, M.C., Bennink, J.R., et al. (1999). Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell Biol.* *146*, 113–124.
- Antonios, J.P., Soto, H., Everson, R.G., Orpilla, J., Moughon, D., Shin, N., Sedighim, S., Yong, W.H., Li, G., Cloughesy, T.F., et al. (2016). PD-1 blockade enhances the vaccination-induced immune response in glioma. *JCI Insight* *1*.
- Apcher, S., Daskalogianni, C., Manoury, B., and Fåhræus, R. (2010). Epstein Barr Virus-Encoded EBNA1 Interference with MHC Class I Antigen Presentation Reveals a Close Correlation between mRNA Translation Initiation and Antigen Presentation. *PLoS Pathog* *6*.
- Apcher, S., Daskalogianni, C., Lejeune, F., Manoury, B., Imhoos, G., Heslop, L., and Fåhræus, R. (2011). Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 11572–11577.
- Apcher, S., Millot, G., Daskalogianni, C., Scherl, A., Manoury, B., and Fåhræus, R. (2013a). Translation of pre-spliced RNAs in the nuclear compartment generates peptides for the MHC class I pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 17951–17956.
- Apcher, S., Millot, G., Daskalogianni, C., Scherl, A., Manoury, B., and Fåhræus, R. (2013b). Translation of pre-spliced RNAs in the nuclear compartment generates peptides for the MHC class I pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 17951–17956.

- Atanackovic, D., Luetkens, T., Kloth, B., Fuchs, G., Cao, Y., Hildebrandt, Y., Meyer, S., Bartels, K., Reinhard, H., Lajmi, N., et al. (2011). Cancer-testis antigen expression and its epigenetic modulation in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology* 86, 918–922.
- Baas, E.J., van Santen, H.M., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., Peters, P.J., and Ploegh, H.L. (1992). Peptide-induced stabilization and intracellular localization of empty HLA class I complexes. *J. Exp. Med.* 176, 147–156.
- Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125, 5591–5596.
- Baranwal, S., Wang, Y., Rathinam, R., Lee, J., Jin, L., McGoey, R., Pylayeva, Y., Giacotti, F., Blobel, G., and Alahari, S. (2011). Molecular Characterization of the Tumor-Suppressive Function of Nischarin in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 103, 1513–1528.
- Bard, J.A.M., Goodall, E.A., Greene, E.R., Jonsson, E., Dong, K.C., and Martin, A. (2018). Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 697–724.
- Bassani-Sternberg, M., Bräunlein, E., Klar, R., Engleitner, T., Sinitcyn, P., Audehm, S., Straub, M., Weber, J., Slotta-Huspenina, J., Specht, K., et al. (2016). Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nature Communications* 7, 1–16.
- Bauer, J., Zieger, N., Nelde, A., Bichmann, L., Salih, H.R., Kanz, L., Rammensee, H.-G., Stevanovic, S., and Walz, J.S. (2018). Mass Spectrometry-Based Immunopeptidome Analysis of Acute Myeloid Leukemia Cells Under Decitabine Treatment Delineates Induced Presentation of Cancer/Testis Antigens on HLA Class I Molecules. *Blood* 132, 5223–5223.
- van Beijnum, J.R., Nowak-Sliwinska, P., Huijbers, E.J.M., Thijssen, V.L., and Griffioen, A.W. (2015). The great escape; the hallmarks of resistance to antiangiogenic therapy. *Pharmacol. Rev.* 67, 441–461.
- Bellamy, W.T., Richter, L., Sirjani, D., Roxas, C., Glinsmann-Gibson, B., Frutiger, Y., Grogan, T.M., and List, A.F. (2001). Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood* 97, 1427–1434.
- Benacerraf, B. (1981). Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212, 1229–1238.
- Bezu, L., Gomes-da-Silva, L.C., Dewitte, H., Breckpot, K., Fucikova, J., Spisek, R., Galluzzi, L.,

- Kepp, O., and Kroemer, G. (2015). Combinatorial Strategies for the Induction of Immunogenic Cell Death. *Front Immunol* 6.
- de Biasi, A.R., Villena-Vargas, J., and Adusumilli, P.S. (2014). Cisplatin-Induced Antitumor Immunomodulation: A Review of Preclinical and Clinical Evidence. *Clin Cancer Res* 20, 5384–5391.
- Bijker, M.S., van den Eeden, S.J.F., Franken, K.L., Melief, C.J.M., van der Burg, S.H., and Offringa, R. (2008). Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 38, 1033–1042.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506–512.
- Blees, A., Janulienė, D., Hofmann, T., Koller, N., Schmidt, C., Trowitzsch, S., Moeller, A., and Tampé, R. (2017). Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature* 551, 525–528.
- von Boehmer, L., Mattle, M., Bode, P., Landshammer, A., Schäfer, C., Nuber, N., Ritter, G., Old, L., Moch, H., Schäfer, N., et al. (2013). NY-ESO-1-specific immunological pressure and escape in a patient with metastatic melanoma. *Cancer Immunol* 13.
- Boni, A., Cogdill, A.P., Dang, P., Udayakumar, D., Njauw, C.-N.J., Sloss, C.M., Ferrone, C.R., Flaherty, K.T., Lawrence, D.P., Fisher, D.E., et al. (2010). Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Res.* 70, 5213–5219.
- Bonifant, C.L., Jackson, H.J., Brentjens, R.J., and Curran, K.J. (2016). Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics* 3, 16011.
- Boon, T., and Van Pel, A. (1989). T cell-recognized antigenic peptides derived from the cellular genome are not protein degradation products but can be generated directly by transcription and translation of short subgenic regions. A hypothesis. *Immunogenetics* 29, 75–79.
- Bose, A., Taylor, J.L., Alber, S., Watkins, S.C., Garcia, J.A., Rini, B.I., Ko, J.S., Cohen, P.A., Finke, J.H., and Storkus, W.J. (2011). Sunitinib facilitates the activation and recruitment of therapeutic anti-tumor immunity in concert with specific vaccination. *Int. J. Cancer* 129, 2158–2170.
- Boulpicante, M., Darrigrand, R., Pierson, A., Salgues, V., Rouillon, M., Gaudineau, B., Khaled, M., Cattaneo, A., Bachi, A., Cascio, P., et al. (2020). Tumors escape immunosurveillance by

- overexpressing the proteasome activator PSME3. *OncoImmunology* 9, 1761205.
- Boyle, L.H., Gillingham, A.K., Munro, S., and Trowsdale, J. (2006). Selective export of HLA-F by its cytoplasmic tail. *J. Immunol.* 176, 6464–6472.
- Brilot, F., Strowig, T., Roberts, S.M., Arrey, F., and Münz, C. (2007). NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15R $\alpha$ . *J Clin Invest* 117, 3316–3329.
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33–39.
- Bruggen, P. van der, Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., Plaen, E.D., Eynde, B.V. den, Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647.
- van der Bruggen, P., Bastin, J., Gajewski, T., Coulie, P.G., Boël, P., De Smet, C., Traversari, C., Townsend, A., and Boon, T. (1994). A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur. J. Immunol.* 24, 3038–3043.
- Buchbinder, E.I., and Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American Journal of Clinical Oncology* 39, 98.
- Bullock, T.N., and Eisenlohr, L.C. (1996). Ribosomal scanning past the primary initiation codon as a mechanism for expression of CTL epitopes encoded in alternative reading frames. *J. Exp. Med.* 184, 1319–1329.
- Bullock, T.N., Patterson, A.E., Franlin, L.L., Notidis, E., and Eisenlohr, L.C. (1997). Initiation codon scanthrough versus termination codon readthrough demonstrates strong potential for major histocompatibility complex class I-restricted cryptic epitope expression. *J. Exp. Med.* 186, 1051–1058.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1–27.
- Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach. *Br Med J* 1, 841–847.
- van Buuren, M.M., Calis, J.J., and Schumacher, T.N. (2014). High sensitivity of cancer exome-based CD8 T cell neo-antigen identification. *Oncoimmunology* 3, e28836.

- Calvo, S.E., Pagliarini, D.J., and Mootha, V.K. (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 7507–7512.
- Caron, E., Vincent, K., Fortier, M.-H., Laverdure, J.-P., Bramoullé, A., Hardy, M.-P., Voisin, G., Roux, P.P., Lemieux, S., Thibault, P., et al. (2011). The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol Syst Biol* *7*, 533.
- Castle, J.C., Kreiter, S., Diekmann, J., Löwer, M., Roemer, N. van de, Graaf, J. de, Selmi, A., Diken, M., Boegel, S., Paret, C., et al. (2012). Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination. *Cancer Res* *72*, 1081–1091.
- Catros, V. (2019). Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux - De nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. *Med Sci (Paris)* *35*, 316–326.
- Chang, M.-H., You, S.-L., Chen, C.-J., Liu, C.-J., Lee, C.-M., Lin, S.-M., Chu, H.-C., Wu, T.-C., Yang, S.-S., Kuo, H.-S., et al. (2009). Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J. Natl. Cancer Inst.* *101*, 1348–1355.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med* *364*, 2507–2516.
- de Charette, M., Marabelle, A., and Houot, R. (2016). Turning tumour cells into antigen presenting cells: The next step to improve cancer immunotherapy? *European Journal of Cancer* *68*, 134–147.
- Chen, L. (2017). P1.07-026 Predicting Tumor Mutational Burden (TMB) and Tumor Neoantigen Burden (TNB) of East Asian ANSCLC Patients by a Targeted Genomic Profiling. *Journal of Thoracic Oncology* *12*, S2006.
- Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., Hu, G., and Sun, Y. (2015a). New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med* *13*.
- Chen, J., Feng, W.-L., Mo, W.-J., Ding, X.-W., and Xie, S.-N. (2015b). Expression of integrin-binding protein Nischarin in metastatic breast cancer. *Mol Med Rep* *12*, 77–82.
- Chesney, J., Imbert-Fernandez, Y., Telang, S., Baum, M., Ranjan, S., Fraig, M., and Batty, N. (2018). Potential clinical and immunotherapeutic utility of talimogene laherparepvec for patients with melanoma after disease progression on immune checkpoint inhibitors and BRAF inhibitors.

Melanoma Res. 28, 250–255.

- Chiang, C.L.-L., Kandalafi, L.E., and Coukos, G. (2011). Adjuvants for enhancing the immunogenicity of whole tumor cell vaccines. *Int. Rev. Immunol.* 30, 150–182.
- Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A., and Strominger, J.L. (1992). Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 358, 764–768.
- Cho, S., Ryoo, J., Jun, Y., and Ahn, K. (2011). Receptor-Mediated ER Export of Human MHC Class I Molecules Is Regulated by the C-Terminal Single Amino Acid. *Traffic* 12, 42–55.
- Chong, E.A., Melenhorst, J.J., Lacey, S.F., Ambrose, D.E., Gonzalez, V., Levine, B.L., June, C.H., and Schuster, S.J. (2017). PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR. *Blood* 129, 1039–1041.
- Chowell, D., Krishna, S., Becker, P.D., Cocita, C., Shu, J., Tan, X., Greenberg, P.D., Klavinskis, L.S., Blattman, J.N., and Anderson, K.S. (2015). TCR contact residue hydrophobicity is a hallmark of immunogenic CD8+ T cell epitopes. *PNAS* 112, E1754–E1762.
- Chraa, D., Naim, A., Olive, D., and Badou, A. (2019). T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *Journal of Leukocyte Biology* 105, 243–255.
- Clifton, G.T., Mittendorf, E.A., and Peoples, G.E. (2015). Adjuvant HER2/neu peptide cancer vaccines in breast cancer. *Immunotherapy* 7, 1159–1168.
- Coffelt, S.B., Wellenstein, M.D., and de Visser, K.E. (2016). Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat. Rev. Cancer* 16, 431–446.
- Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 14, 199–220.
- Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3–20.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80, 2012–2020.
- Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 14, 135–146.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Fenteany, G., Goldberg, A.L., and Rock, K.L.

- (1997). Lactacystin and clasto-Lactacystin  $\beta$ -Lactone Modify Multiple Proteasome  $\beta$ -Subunits and Inhibit Intracellular Protein Degradation and Major Histocompatibility Complex Class I Antigen Presentation. *J. Biol. Chem.* 272, 13437–13445.
- Crotzer, V.L., and Blum, J.S. (2010). Autophagy and adaptive immunity. *Immunology* 131, 9–17.
- Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., et al. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* 9, 562–567.
- Curran, M.A., and Glisson, B.S. (2019). New Hope for Therapeutic Cancer Vaccines in the Era of Immune Checkpoint Modulation. *Annu. Rev. Med.* 70, 409–424.
- Dahlberg, J.E., Lund, E., and Goodwin, E.B. (2003). Nuclear translation: what is the evidence? *RNA* 9, 1–8.
- Dausset, J. (1958). Iso-leuco-anticorps. *AHA* 20, 156–166.
- David, A., Dolan, B.P., Hickman, H.D., Knowlton, J.J., Clavarino, G., Pierre, P., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2012). Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *J Cell Biol* 197, 45–57.
- De Jager, R., Guinan, P., Lamm, D., Khanna, O., Brosman, S., De Kernion, J., Williams, R., Richardson, C., Muenz, L., and Reitsma, D. (1991). Long-term complete remission in bladder carcinoma in situ with intravesical TICE bacillus Calmette Guerin. Overview analysis of six phase II clinical trials. *Urology* 38, 507–513.
- De Smet, C., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V., and Boon, T. (1999). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7327–7335.
- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Müller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., et al. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7922–7927.
- Deniger, D.C., Kwong, M.L.M., Pasetto, A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Langan, M.M., Lee, C.-C.R., and Rosenberg, S.A. (2017). A Pilot Trial of the Combination of Vemurafenib with Adoptive Cell Therapy in Patients with Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 23, 351–362.
- Deniger, D.C., Pasetto, A., Robbins, P.F., Gartner, J.J., Prickett, T.D., Paria, B.C., Malekzadeh, P., Jia,

- L., Yossef, R., Langan, M.M., et al. (2018). T-cell Responses to TP53 “Hotspot” Mutations and Unique Neoantigens Expressed by Human Ovarian Cancers. *Clin. Cancer Res.* 24, 5562–5573.
- Dhawan, P., and Richmond, A. (2002). Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J. Leukoc. Biol.* 72, 9–18.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–3290.
- Di, S., Zhou, M., Pan, Z., Sun, R., Chen, M., Jiang, H., Shi, B., Luo, H., and Li, Z. (2019). Combined Adjuvant of Poly I:C Improves Antitumor Effects of CAR-T Cells. *Front Oncol* 9.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447–456.
- Dong, S., Ruiz-Calderon, B., Rathinam, R., Eastlack, S., Maziveyi, M., and Alahari, S.K. (2019). Knockout model reveals the role of Nischarin in mammary gland development, breast tumorigenesis and response to metformin treatment. *Int. J. Cancer.*
- Dongre, A.R., Kovats, S., deRoos, P., McCormack, A.L., Nakagawa, T., Paharkova-Vatchkova, V., Eng, J., Caldwell, H., Iii, J.R.Y., and Rudensky, A.Y. (2001). In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *European Journal of Immunology* 31, 1485–1494.
- Duan, F., Duitama, J., Al Seesi, S., Ayres, C.M., Corcelli, S.A., Pawashe, A.P., Blanchard, T., McMahon, D., Sidney, J., Sette, A., et al. (2014). Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *Journal of Experimental Medicine* 211, 2231–2248.
- Duffner, U., Abdel-Mageed, A., Younge, J., Tornga, C., Scott, K., Staddon, J., Elliott, K., Stumph, J., and Kidd, P. (2016). The possible perils of targeted therapy. *Leukemia* 30, 1619–1621.
- Dummer, R., Ascierto, P.A., Gogas, H.J., Arance, A., Mandalá, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., Gutzmer, R., et al. (2018). Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 19, 1315–1327.

- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.
- Duraiswamy, J., Kaluza, K.M., Freeman, G.J., and Coukos, G. (2013). Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res.* 73, 3591–3603.
- Duvallet, E., Boulpicante, M., Yamazaki, T., Daskalogianni, C., Prado Martins, R., Baconnais, S., Manoury, B., Fahraeus, R., and Apcher, S. (2016). Exosome-driven transfer of tumor-associated Pioneer Translation Products (TA-PTPs) for the MHC class I cross-presentation pathway. *Oncoimmunology* 5, e1198865.
- Dyck, L., and Mills, K.H.G. (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European Journal of Immunology* 47, 765–779.
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 42, 17–47.
- Ellyard, J.I., Simson, L., and Parish, C.R. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* 70, 1–11.
- Engelhard, V.H., Bullock, T.N.J., Colella, T.A., Sheasley, S.L., and Mullins, D.W. (2002). Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188, 136–146.
- Esquivel, F., Yewdell, J., and Bennink, J. (1992). RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 175, 163–168.
- Eswarappa, S.M., Potdar, A.A., Koch, W.J., Fan, Y., Vasu, K., Lindner, D., Willard, B., Graham, L.M., DiCorleto, P.E., and Fox, P.L. (2014). Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell* 157, 1605–1618.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G., and Rammensee, H.-G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290–296.
- Farfán-Arribas, D.J., Stern, L.J., and Rock, K.L. (2012). Using intein catalysis to probe the origin of major histocompatibility complex class I-presented peptides. *PNAS* 109, 16998–17003.
- Farsaci, B., Higgins, J.P., and Hodge, J.W. (2012). Consequence of dose scheduling of sunitinib on

- host immune response elements and vaccine combination therapy. *Int. J. Cancer* *130*, 1948–1959.
- Felix, K., and Gaida, M.M. (2016). Neutrophil-Derived Proteases in the Microenvironment of Pancreatic Cancer -Active Players in Tumor Progression. *Int. J. Biol. Sci.* *12*, 302–313.
- Fennemann, F.L., de Vries, I.J.M., Figdor, C.G., and Verdoes, M. (2019). Attacking Tumors From All Sides: Personalized Multiplex Vaccines to Tackle Intratumor Heterogeneity. *Front Immunol* *10*.
- Fetten, J.V., Roy, N., and Gilboa, E. (1991). A frameshift mutation at the NH2 terminus of the nucleoprotein gene does not affect generation of cytotoxic T lymphocyte epitopes. *J. Immunol.* *147*, 2697–2705.
- Finn, O.J., and Forni, G. (2002). Prophylactic cancer vaccines. *Current Opinion in Immunology* *14*, 172–177.
- Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L.V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., et al. (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* *367*, 107–114.
- Foley, E.J. (1953). Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* *13*, 835–837.
- Fortier, M.-H., Caron, E., Hardy, M.-P., Voisin, G., Lemieux, S., Perreault, C., and Thibault, P. (2008). The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J. Exp. Med.* *205*, 595–610.
- Frassanito, M.A., Saltarella, I., Vinella, A., Muzio, L.L., Pannone, G., Fumarulo, R., Vacca, A., and Marigliò, M.A. (2019). Survivin overexpression in head and neck squamous cell carcinomas as a new therapeutic target (Review). *Oncol. Rep.* *41*, 2615–2624.
- Frederick, D.T., Piris, A., Cogdill, A.P., Cooper, Z.A., Lezcano, C., Ferrone, C.R., Mitra, D., Boni, A., Newton, L.P., Liu, C., et al. (2013). BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* *19*, 1225–1231.
- Fridlender, Z.G., and Albelda, S.M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* *33*, 949–955.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* *12*, 298–306.

- Frigola, J., Sabarinathan, R., Mularoni, L., Muiños, F., Gonzalez-Perez, A., and López-Bigas, N. (2017). Reduced mutation rate in exons due to differential mismatch repair. *Nature Genetics* 49, 1684–1692.
- Fritsch, E.F., Rajasagi, M., Ott, P.A., Brusic, V., Hacoheh, N., and Wu, C.J. (2014). HLA-binding properties of tumor neoepitopes in humans. *Cancer Immunol Res* 2, 522–529.
- Fuertes Marraco, S.A., Neubert, N.J., Verdeil, G., and Speiser, D.E. (2015). Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol* 6, 310.
- Gabrilovich, D.I. (2017). Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res* 5, 3–8.
- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174.
- Gaczynska, M., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365, 264–267.
- Garbi, N., Tan, P., Diehl, A.D., Chambers, B.J., Ljunggren, H.-G., Momburg, F., and Hämmerling, G.J. (2000). Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nature Immunology* 1, 234–238.
- Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E., and Wiley, D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134–141.
- Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L., and Wilson, I.A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209–219.
- Garcia-Garijo, A., Fajardo, C.A., and Gros, A. (2019). Determinants for Neoantigen Identification. *Front Immunol* 10.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pérez-Villar, J.J., López-Botet, M., Duggan-Keen, M., and Stern, P.L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 18, 89–95.
- Garstka, M., Borchert, B., Al-Balushi, M., Praveen, P.V.K., Köhl, N., Majoul, I., Duden, R., and Springer, S. (2007). Peptide-receptive major histocompatibility complex class I molecules cycle between endoplasmic reticulum and cis-Golgi in wild-type lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 30680–30690.

- Gee, M.H., Han, A., Lofgren, S.M., Beausang, J.F., Mendoza, J.L., Birnbaum, M.E., Bethune, M.T., Fischer, S., Yang, X., Gomez-Eerland, R., et al. (2018). Antigen Identification for Orphan T Cell Receptors Expressed on Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Cell* 172, 549-563.e16.
- Gerashchenko, M.V., Lobanov, A.V., and Gladyshev, V.N. (2012). Genome-wide ribosome profiling reveals complex translational regulation in response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17394–17399.
- Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605–609.
- Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2003). The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalpha+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J. Exp. Med.* 198, 747–755.
- Giuliano, S., Cormerais, Y., Dufies, M., Grépin, R., Colosetti, P., Belaid, A., Parola, J., Martin, A., Lacas-Gervais, S., Mazure, N.M., et al. (2015). Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux. *Autophagy* 11, 1891–1904.
- Gjerstorff, M.F., Andersen, M.H., and Ditzel, H.J. (2015). Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget* 6, 15772–15787.
- Godfrey, D.I., Koay, H.-F., McCluskey, J., and Gherardin, N.A. (2019). The biology and functional importance of MAIT cells. *Nature Immunology* 20, 1110–1128.
- Gonzalez-Galarza, F.F., Lawless, C., Hubbard, S.J., Fan, J., Bessant, C., Hermjakob, H., and Jones, A.R. (2012). A Critical Appraisal of Techniques, Software Packages, and Standards for Quantitative Proteomic Analysis. *OMICS* 16, 431–442.
- Gorer, P.A. (1936). The Detection of Antigenic Differences in Mouse Erythrocytes by the Employment of Immune Sera. *Br J Exp Pathol* 17, 42–50.
- Graddis, T.J., McMahan, C.J., Tamman, J., Page, K.J., and Trager, J.B. (2011). Prostatic acid phosphatase expression in human tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 4, 295–306.
- Granados, D.P., Yahyaoui, W., Laumont, C.M., Daouda, T., Muratore-Schroeder, T.L., Côté, C., Laverdure, J.-P., Lemieux, S., Thibault, P., and Perreault, C. (2012). MHC I-associated peptides

- preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements. *Blood* 119, e181–e191.
- Granados, D.P., Laumont, C.M., Thibault, P., and Perreault, C. (2015). The nature of self for T cells—a systems-level perspective. *Current Opinion in Immunology* 34, 1–8.
- Grande, A.G., and Van Kaer, L. (2001). Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends in Immunology* 22, 194–199.
- Grande III, A.G., Golovina, T.N., Hamilton, S.E., Sriram, V., Spies, T., Brutkiewicz, R.R., Harty, J.T., Eisenlohr, L.C., and Van Kaer, L. (2000). Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in Tapasin mutant mice. *Immunity* 13, 213–222.
- Gravett, A.M., Trautwein, N., Stevanović, S., Dalglish, A.G., and Copier, J. (2018). Gemcitabine alters the proteasome composition and immunopeptidome of tumour cells. *Oncoimmunology* 7, e1438107.
- Greenberg, A.H., and Greene, M. (1976). Non-adaptive rejection of small tumour inocula as a model of immune surveillance. *Nature* 264, 356–359.
- Griffin, J.D., Cannistra, S.A., Sullivan, R., Demetri, G.D., Ernst, T.J., and Kanakura, Y. (1990). The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. *Int. J. Cell Cloning* 8 Suppl 1, 35–44; discussion 44–45.
- Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.-Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., et al. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* 491, 254–258.
- Gross, L. (1943). Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line. *Cancer Res* 3, 326–333.
- Gulley, J.L., Madan, R.A., Pachynski, R., Mulders, P., Sheikh, N.A., Trager, J., and Drake, C.G. (2017). Role of Antigen Spread and Distinctive Characteristics of Immunotherapy in Cancer Treatment. *J Natl Cancer Inst* 109.
- Guo, F.F., and Cui, J.W. (2019). The Role of Tumor-Infiltrating B Cells in Tumor Immunity.
- Haas, G.G., D’Cruz, O.J., and De Bault, L.E. (1988). Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18, 47–51.
- Hailemichael, Y., Dai, Z., Jaffarzad, N., Ye, Y., Medina, M.A., Huang, X.-F., Dorta-Estremera, S.M.,

- Greeley, N.R., Nitti, G., Peng, W., et al. (2013). Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cell sequestration, dysfunction and deletion. *Nat Med* 19, 465–472.
- Hammer, G.E., Kanaseki, T., and Shastri, N. (2007). The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity* 26, 397–406.
- Heery, C.R., Madan, R.A., Stein, M.N., Stadler, W.M., Di Paola, R.S., Rauckhorst, M., Steinberg, S.M., Marté, J.L., Chen, C.C., Grenga, I., et al. (2016). Samarium-153-EDTMP (Quadramet®) with or without vaccine in metastatic castration-resistant prostate cancer: A randomized Phase 2 trial. *Oncotarget* 7, 69014–69023.
- Heinen, E. (2001). Immunological Discrimination Between Self and Nonself. In *ELS*, (American Cancer Society), p.
- Hérin, M., Lemoine, C., Weynants, P., Vessièrre, F., Van Pel, A., Knuth, A., Devos, R., and Boon, T. (1987). Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma. *Int. J. Cancer* 39, 390–396.
- Heylmann, D., Bauer, M., Becker, H., van Gool, S., Bacher, N., Steinbrink, K., and Kaina, B. (2013). Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. *PLoS ONE* 8, e83384.
- Hijikata, Y., Okazaki, T., Tanaka, Y., Murahashi, M., Yamada, Y., Yamada, K., Takahashi, A., Inoue, H., Kishimoto, J., Nakanishi, Y., et al. (2018). A phase I clinical trial of RNF43 peptide-related immune cell therapy combined with low-dose cyclophosphamide in patients with advanced solid tumors. *PLOS ONE* 13, e0187878.
- Hilf, N., Kuttruff-Coqui, S., Frenzel, K., Bukur, V., Stevanović, S., Gouttefangeas, C., Platten, M., Tabatabai, G., Dutoit, V., van der Burg, S.H., et al. (2019). Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* 565, 240–245.
- Hinrichs, C.S., Borman, Z.A., Gattinoni, L., Yu, Z., Burns, W.R., Huang, J., Klebanoff, C.A., Johnson, L.A., Kerkar, S.P., Yang, S., et al. (2011). Human effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood* 117, 808–814.
- Ho, O., and Green, W.R. (2006). Alternative Translational Products and Cryptic T Cell Epitopes: Expecting the Unexpected. *The Journal of Immunology* 177, 8283–8289.
- Hodi, F.S., O’Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R.,

- Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine* *363*, 711.
- Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Eichhoff, O.M., Widmer, D.S., Praetorius, C., Einarsson, S.O., Valgeirsdottir, S., Bergsteinsdottir, K., Schepsky, A., Dummer, R., et al. (2008). Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res* *21*, 665–676.
- Hollingsworth, R.E., and Jansen, K. (2019). Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *Npj Vaccines* *4*, 1–10.
- Hong, D.S., Kurzrock, R., Naing, A., Wheler, J.J., Falchook, G.S., Schiffman, J.S., Faulkner, N., Pilat, M.J., O'Brien, J., and LoRusso, P. (2014). A phase I, open-label, single-arm, dose-escalation study of E7107, a precursor messenger ribonucleic acid (pre-mRNA) spliceosome inhibitor administered intravenously on days 1 and 8 every 21 days to patients with solid tumors. *Invest New Drugs* *32*, 436–444.
- Hörig, H., Young, A.C., Papadopoulos, N.J., DiLorenzo, T.P., and Nathenson, S.G. (1999). Binding of longer peptides to the H-2Kb heterodimer is restricted to peptides extended at their C terminus: refinement of the inherent MHC class I peptide binding criteria. *J. Immunol.* *163*, 4434–4441.
- Howarth, M., Williams, A., Tolstrup, A.B., and Elliott, T. (2004). Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 11737–11742.
- Hsu, V.W., Yuan, L.C., Nuchtern, J.G., Lippincott-Schwartz, J., Hammerling, G.J., and Klausner, R.D. (1991). A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for retention of unassembled MHC class I molecules. *Nature* *352*, 441–444.
- Hueman, M.T., Stojadinovic, A., Storrer, C.E., Foley, R.J., Gurney, J.M., Shriver, C.D., Ponniah, S., and Peoples, G.E. (2006). Levels of circulating regulatory CD4+CD25+ T cells are decreased in breast cancer patients after vaccination with a HER2/neu peptide (E75) and GM-CSF vaccine. *Breast Cancer Res. Treat.* *98*, 17–29.
- Hughes, E., Scurr, M., Campbell, E., Jones, E., Godkin, A., and Gallimore, A. (2018). T-cell modulation by cyclophosphamide for tumour therapy. *Immunology* *154*, 62–68.
- Hukelmann, J.L., Anderson, K.E., Sinclair, L.V., Grzes, K.M., Murillo, A.B., Hawkins, P.T., Stephens, L.R., Lamond, A.I., and Cantrell, D.A. (2016). The cytotoxic T cell proteome and its shaping by the kinase mTOR. *Nat Immunol* *17*, 104–112.

- Hunt, D., Henderson, R., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A., Appella, E., and Engelhard, V. (1992). Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255, 1261–1263.
- Iacovides, D., Michael, S., Achilleos, C., and Strati, K. (2013). Shared mechanisms in stemness and carcinogenesis: lessons from oncogenic viruses. *Front Cell Infect Microbiol* 3.
- Iclozan, C., Antonia, S., Chiappori, A., Chen, D.-T., and Gabrilovich, D. (2013). Therapeutic regulation of myeloid-derived suppressor cells and immune response to cancer vaccine in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 909–918.
- Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., et al. (1997). Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89, 1405–1412.
- Jablonska, J., Wu, C.-F., Andzinski, L., Leschner, S., and Weiss, S. (2014). CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN- $\beta$ . *Int. J. Cancer* 134, 1346–1358.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113–127.
- Jacobs, J.F.M., Punt, C.J.A., Lesterhuis, W.J., Suttmuller, R.P.M., Brouwer, H.M.-L.H., Scharenborg, N.M., Klasen, I.S., Hilbrands, L.B., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., et al. (2010). Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase I/II study in metastatic melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 16, 5067–5078.
- Jacobs, J.J.L., Snackey, C., Geldof, A.A., Characiejus, D., Moorselaar, R.J. a. V., and Otter, W.D. (2014). Inefficacy of Therapeutic Cancer Vaccines and Proposed Improvements. *Casus of Prostate Cancer. Anticancer Res* 34, 2689–2700.
- Jacquelot, N., Roberti, M.P., Enot, D.P., Rusakiewicz, S., Ternès, N., Jegou, S., Woods, D.M., Sodré, A.L., Hansen, M., Meirow, Y., et al. (2017). Predictors of responses to immune checkpoint blockade in advanced melanoma. *Nature Communications* 8, 1–13.
- Jallow, S., Leligdowicz, A., Kramer, H.B., Onyango, C., Cotten, M., Wright, C., Whittle, H.C., McMichael, A., Dong, T., Kessler, B.M., et al. (2015). The presence of prolines in the flanking region of an immunodominant HIV-2 gag epitope influences the quality and quantity of the epitope generated. *European Journal of Immunology* 45, 2232–2242.

- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4<sup>+</sup> T cells are required for secondary expansion and memory in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Nature* *421*, 852–856.
- Javitt, A., Barnea, E., Kramer, M.P., Wolf-Levy, H., Levin, Y., Admon, A., and Merbl, Y. (2019). Pro-inflammatory Cytokines Alter the Immunoepitome Landscape by Modulation of HLA-B Expression. *Front Immunol* *10*.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 557–569.
- Johnsen, A.K., Templeton, D.J., Sy, M.-S., and Harding, C.V. (1999). Deficiency of Transporter for Antigen Presentation (TAP) in Tumor Cells Allows Evasion of Immune Surveillance and Increases Tumorigenesis. *The Journal of Immunology* *163*, 4224–4231.
- Jones, P.A., Ohtani, H., Chakravarthy, A., and De Carvalho, D.D. (2019). Epigenetic therapy in immune-oncology. *Nat. Rev. Cancer* *19*, 151–161.
- Jorge, J., Petronilho, S., Alves, R., Coucelo, M., Gonçalves, A.C., Nascimento Costa, J.M., and Sarmiento-Ribeiro, A.B. (2019). Apoptosis induction and cell cycle arrest of pladienolide B in erythroleukemia cell lines. *Invest New Drugs*.
- Jung, H., Lee, D., Lee, J., Park, D., Kim, Y.J., Park, W.-Y., Hong, D., Park, P.J., and Lee, E. (2015). Intron retention is a widespread mechanism of tumor-suppressor inactivation. *Nature Genetics* *47*, 1242–1248.
- Jurtz, V., Paul, S., Andreatta, M., Marcatili, P., Peters, B., and Nielsen, M. (2017). NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *J. Immunol.* *199*, 3360–3368.
- Kaczanowska, S., Joseph, A.M., and Davila, E. (2013). TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* *93*, 847–863.
- Kagoya, Y., Tanaka, S., Guo, T., Anczurowski, M., Wang, C.-H., Saso, K., Butler, M.O., Minden, M.D., and Hirano, N. (2018). A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat. Med.* *24*, 352–359.
- Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., et al. (2007). Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 576–583.

- Kalaora, S., Barnea, E., Merhavi-Shoham, E., Qutob, N., Teer, J.K., Shimony, N., Schachter, J., Rosenberg, S.A., Besser, M.J., Admon, A., et al. (2016). Use of HLA peptidomics and whole exome sequencing to identify human immunogenic neo-antigens. *Oncotarget* 7, 5110–5117.
- Kang, C.-W., Dutta, A., Chang, L.-Y., Mahalingam, J., Lin, Y.-C., Chiang, J.-M., Hsu, C.-Y., Huang, C.-T., Su, W.-T., Chu, Y.-Y., et al. (2015). Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3+CD8+ T cells in colon cancer. *Sci Rep* 5, 15659.
- Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., et al. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 411–422.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556–7561.
- Kast, W.M., Bronkhorst, A.M., de Waal, L.P., and Melief, C.J. (1986). Cooperation between cytotoxic and helper T lymphocytes in protection against lethal Sendai virus infection. Protection by T cells is MHC-restricted and MHC-regulated; a model for MHC-disease associations. *J. Exp. Med.* 164, 723–738.
- Kato, T., Matsuda, T., Ikeda, Y., Park, J.-H., Leisegang, M., Yoshimura, S., Hikichi, T., Harada, M., Zewde, M., Sato, S., et al. (2018). Effective screening of T cells recognizing neoantigens and construction of T-cell receptor-engineered T cells. *Oncotarget* 9, 11009–11019.
- Kearse, M.G., and Wilusz, J.E. (2017). Non-AUG translation: a new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes Dev.* 31, 1717–1731.
- Kenter, G.G., Welters, M.J.P., Valentijn, A.R.P.M., Lowik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Vloon, A.P.G., Essahsah, F., Fathers, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., et al. (2009). Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *New England Journal of Medicine* 361, 1838–1847.
- Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., Agostinis, P., Apetoh, L., Aranda, F., Barnaba, V., Bloy, N., et al. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3, e955691.
- Keskin, D.B., Anandappa, A.J., Sun, J., Tirosh, I., Mathewson, N.D., Li, S., Oliveira, G., Giobbie-Hurder, A., Felt, K., Gjini, E., et al. (2019). Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature* 565, 234–239.

- Khan, A.N.H., Gregorie, C.J., and Tomasi, T.B. (2008). Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* *57*, 647–654.
- Khong, H., and Overwijk, W.W. (2016). Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J Immunother Cancer* *4*, 56.
- Khurana, E., Fu, Y., Chakravarty, D., Demichelis, F., Rubin, M.A., and Gerstein, M. (2016). Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nat. Rev. Genet.* *17*, 93–108.
- Kienzle, N., Buck, M., Silins, S.L., Burrows, S.R., Moss, D.J., Winterhalter, A., Brooks, A., and Khanna, R. (2000). Differential Splicing of Antigen-Encoding RNA Reduces Endogenous Epitope Presentation That Regulates the Expansion and Cytotoxicity of T Cells. *The Journal of Immunology* *165*, 1840–1846.
- Kimura, H., Caturegli, P., Takahashi, M., and Suzuki, K. (2015). New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *J Immunol Res* *2015*, 541984.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. *Nat Rev Immunol* *14*, 377–391.
- Kloss, C.C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M., and Sadelain, M. (2013). Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat. Biotechnol.* *31*, 71–75.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 485–517.
- Kotake, Y., Sagane, K., Owa, T., Mimori-Kiyosue, Y., Shimizu, H., Uesugi, M., Ishihama, Y., Iwata, M., and Mizui, Y. (2007). Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 570–575.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 51–72.
- Krysko, D.V., Vanden Berghe, T., Parthoens, E., D'Herde, K., and Vandenabeele, P. (2008). Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Meth. Enzymol.* *442*, 307–341.
- Kumai, T., Kobayashi, H., Harabuchi, Y., and Celis, E. (2017). Peptide vaccines in cancer — old concept revisited. *Current Opinion in Immunology* *45*, 1–7.

- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* *157*, 1013–1022.
- Lanoix, J., Durette, C., Courcelles, M., Cossette, É., Comtois-Marotte, S., Hardy, M.-P., Côté, C., Perreault, C., and Thibault, P. (2018). Comparison of the MHC I Immunopeptidome Repertoire of B-Cell Lymphoblasts Using Two Isolation Methods. *Proteomics* *18*, e1700251.
- Laoui, D., Movahedi, K., Van Overmeire, E., Van den Bossche, J., Schouppe, E., Mommer, C., Nikolaou, A., Morias, Y., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2011). Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int. J. Dev. Biol.* *55*, 861–867.
- Larmonier, N., Mérino, D., Nicolas, A., Cathelin, D., Besson, A., Bateman, A., Solary, E., Martin, F., Katsanis, E., and Bonnotte, B. (2006). Apoptotic, necrotic, or fused tumor cells: an equivalent source of antigen for dendritic cell loading. *Apoptosis* *11*, 1513–1524.
- Laumont, C.M., and Perreault, C. (2017). Exploiting non-canonical translation to identify new targets for T cell-based cancer immunotherapy. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Laumont, C.M., Daouda, T., Laverdure, J.-P., Bonneil, É., Caron-Lizotte, O., Hardy, M.-P., Granados, D.P., Durette, C., Lemieux, S., Thibault, P., et al. (2016). Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nat Commun* *7*, 10238.
- Laumont, C.M., Vincent, K., Hesnard, L., Audemard, É., Bonneil, É., Laverdure, J.-P., Gendron, P., Courcelles, M., Hardy, M.-P., Côté, C., et al. (2018). Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci Transl Med* *10*.
- Lawson, D.H., Lee, S., Zhao, F., Tarhini, A.A., Margolin, K.A., Ernstoff, M.S., Atkins, M.B., Cohen, G.I., Whiteside, T.L., Butterfield, L.H., et al. (2015). Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Yeast-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Versus Peptide Vaccination Versus GM-CSF Plus Peptide Vaccination Versus Placebo in Patients With No Evidence of Disease After Complete Surgical Resection of Locally Advanced and/or Stage IV Melanoma: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group-American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group (E4697). *J. Clin. Oncol.* *33*, 4066–4076.
- Le, D.T., Lutz, E., Uram, J.N., Sugar, E.A., Onners, B., Solt, S., Zheng, L., Diaz, L.A., Donehower, R.C., Jaffee, E.M., et al. (2013). Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer.

- J. Immunother. 36, 382–389.
- Le Gal, F.-A., Lefebvre, P., Deschemin, J.-C., Andrieu, M., Guillet, J.-G., Avril, M.-F., Bosq, J., and Dore, M.-X. (2001). Direct Evidence to Support the Role of Antigen-Specific CD8+ T Cells in Melanoma-Associated Vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology* 117, 1464–1470.
- Lee, M., Samstein, R.M., Valero, C., Chan, T.A., and Morris, L.G.T. (2019). Tumor mutational burden as a predictive biomarker for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 1–4.
- Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R.A., Lifke, A., Ferel, D., Wölfel, C., Huber, C., and Wölfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16013–16018.
- Leone, P., Shin, E.-C., Perosa, F., Vacca, A., Dammacco, F., and Racanelli, V. (2013). MHC Class I Antigen Processing and Presenting Machinery: Organization, Function, and Defects in Tumor Cells. *J Natl Cancer Inst* 105, 1172–1187.
- Leung, C.S.K. (2015). Endogenous Antigen Presentation of MHC Class II Epitopes through Non-Autophagic Pathways. *Front Immunol* 6.
- Lev, A., Princiotta, M.F., Zanker, D., Takeda, K., Gibbs, J.S., Kumagai, C., Waffarn, E., Dolan, B.P., Burgevin, A., Van Endert, P., et al. (2010). Compartmentalized MHC class I antigen processing enhances immunosurveillance by circumventing the law of mass action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6964–6969.
- Li, H., and Rostami, A. (2010). IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 198–209.
- Li, H., Ding, J., Lu, M., Liu, H., Miao, Y., Li, L., Wang, G., Zheng, J., Pei, D., and Zhang, Q. (2019). CAIX-specific CAR-T Cells and Sunitinib Show Synergistic Effects Against Metastatic Renal Cancer Models. *J. Immunother.*
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 361–370.
- Lin, Y., Xu, J., and Lan, H. (2019). Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of Hematology & Oncology* 12, 76.
- Lindblad, E.B., and Schønberg, N.E. (2010). Aluminum adjuvants: preparation, application, dosage, and formulation with antigen. *Methods Mol. Biol.* 626, 41–58.

- Little, C.C., and Tyzzer, E.E. (1916). Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a Transplantable tumor, Carcinoma (J. W. A.) of the Japanese waltzing Mouse. *J Med Res* 33, 393–453.
- Liu, W.M., Fowler, D.W., Smith, P., and Dalgleish, A.G. (2010). Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br. J. Cancer* 102, 115–123.
- Liu, X., Ranganathan, R., Jiang, S., Fang, C., Sun, J., Kim, S., Newick, K., Lo, A., June, C.H., Zhao, Y., et al. (2016). A Chimeric Switch-Receptor Targeting PD1 Augments the Efficacy of Second-Generation CAR T Cells in Advanced Solid Tumors. *Cancer Res.* 76, 1578–1590.
- Ljunggren, H.G., Stam, N.J., Ohlén, C., Neefjes, J.J., Höglund, P., Heemels, M.T., Bastin, J., Schumacher, T.N., Townsend, A., and Kärre, K. (1990). Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346, 476–480.
- Loeb, L.A., Loeb, K.R., and Anderson, J.P. (2003). Multiple mutations and cancer. *PNAS* 100, 776–781.
- Löffler, M.W., Mohr, C., Bichmann, L., Freudenmann, L.K., Walzer, M., Schroeder, C.M., Trautwein, N., Hilke, F.J., Zinser, R.S., Mühlenbruch, L., et al. (2019). Multi-omics discovery of exome-derived neoantigens in hepatocellular carcinoma. *Genome Medicine* 11, 28.
- Lollini, P.-L., Cavallo, F., Nanni, P., and Quaglino, E. (2015). The Promise of Preventive Cancer Vaccines. *Vaccines (Basel)* 3, 467–489.
- Long, L., Zhang, X., Chen, F., Pan, Q., Phiphatwatchara, P., Zeng, Y., and Chen, H. (2018). The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer* 9, 176–189.
- Lu, Y.-C., and Robbins, P.F. (2016). Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Semin Immunol* 28, 22–27.
- Lu, Y.-C., Yao, X., Crystal, J.S., Li, Y.F., El-Gamil, M., Gross, C., Davis, L., Dudley, M.E., Yang, J.C., Samuels, Y., et al. (2014). Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. *Clin. Cancer Res.* 20, 3401–3410.
- Luckey, C.J., King, G.M., Marto, J.A., Venketeswaran, S., Maier, B.F., Crotzer, V.L., Colella, T.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Engelhard, V.H. (1998). Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J.*

Immunol. *161*, 112–121.

- Łuczynski, W., Kowalczyk, O., Hendo, E., Stasiak-Barmuta, A., and Krawczyk-Rybak, M. (2007). Upregulation of antigen-processing machinery components at mRNA level in acute lymphoblastic leukemia cells after CD40 stimulation. *Ann Hematol* *86*, 339–345.
- Lugade, A.A., Sorensen, E.W., Gerber, S.A., Moran, J.P., Frelinger, J.G., and Lord, E.M. (2008). Radiation-Induced IFN- $\gamma$  Production within the Tumor Microenvironment Influences Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology* *180*, 3132–3139.
- Lund, F.E., Garvy, B.A., Randall, T.D., and Harris, D.P. (2005). Regulatory Roles for Cytokine-Producing B Cells in Infection and Autoimmune Disease. *B Cell Trophic Factors and B Cell Antagonism in Autoimmune Disease* *8*, 25–54.
- Lupetti, R., Pisarra, P., Verrecchia, A., Farina, C., Nicolini, G., Anichini, A., Bordignon, C., Sensi, M., Parmiani, G., and Traversari, C. (1998). Translation of a Retained Intron in Tyrosinase-related Protein (TRP) 2 mRNA Generates a New Cytotoxic T Lymphocyte (CTL)-defined and Shared Human Melanoma Antigen Not Expressed in Normal Cells of the Melanocytic Lineage. *J Exp Med* *188*, 1005–1016.
- Luque-Cabal, M., García-Tejido, P., Fernández-Pérez, Y., Sánchez-Lorenzo, L., and Palacio-Vázquez, I. (2016). Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It. *Clin Med Insights Oncol* *10*, 21–30.
- Lurquin, C., Van Pel, A., Mariamé, B., De Plaen, E., Szikora, J.-P., Janssens, C., Reddehase, M.J., Lejeune, J., and Boon, T. (1989). Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: The mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell* *58*, 293–303.
- Ma, Q.-Y., Huang, D.-Y., Zhang, H.-J., Chen, J., Miller, W., and Chen, X.-F. (2016). Function of follicular helper T cell is impaired and correlates with survival time in non-small cell lung cancer. *Int. Immunopharmacol.* *41*, 1–7.
- Mahmutefendić, H., Blagojević Zagorac, G., Grabušić, K., Karleuša, L., Maćešić, S., Momburg, F., and Lučin, P. (2017). Late Endosomal Recycling of Open MHC-I Conformers. *J. Cell. Physiol.* *232*, 872–887.
- Malarkannan, S., Horng, T., Shih, P.P., Schwab, S., and Shastri, N. (1999). Presentation of Out-of-Frame Peptide/MHC Class I Complexes by a Novel Translation Initiation Mechanism. *Immunity* *10*, 681–690.

- Malekzadeh, P., Pasetto, A., Robbins, P.F., Parkhurst, M.R., Paria, B.C., Jia, L., Gartner, J.J., Hill, V., Yu, Z., Restifo, N.P., et al. (2019). Neoantigen screening identifies broad *TP53* mutant immunogenicity in patients with epithelial cancers. *J Clin Invest* *129*, 1109–1114.
- Manning, J., Indrova, M., Lubyova, B., Pribylova, H., Bieblova, J., Hejnar, J., Simova, J., Jandlova, T., Bubenik, J., and Reinis, M. (2008). Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* *123*, 218–227.
- Mao, I., Liu, J., Li, X., and Luo, H. (2008). REGgamma, a proteasome activator and beyond? *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 3971–3980.
- Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* *74*, 181–273.
- Martinet, L., and Smyth, M.J. (2015). Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 243–254.
- Massarelli, E., William, W., Johnson, F., Kies, M., Ferrarotto, R., Guo, M., Feng, L., Lee, J.J., Tran, H., Kim, Y.U., et al. (2019). Combining Immune Checkpoint Blockade and Tumor-Specific Vaccine for Patients With Incurable Human Papillomavirus 16-Related Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* *5*, 67–73.
- Mateyak, M.K., and Kinzy, T.G. (2010). eEF1A: Thinking Outside the Ribosome. *J Biol Chem* *285*, 21209–21213.
- Matsuda, T., Leisegang, M., Park, J.-H., Ren, L., Kato, T., Ikeda, Y., Harada, M., Kiyotani, K., Lengyel, E., Fleming, G.F., et al. (2018). Induction of Neoantigen-Specific Cytotoxic T Cells and Construction of T-cell Receptor-Engineered T Cells for Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* *24*, 5357–5367.
- Matsui, K., O'Mara, L.A., and Allen, P.M. (2003). Successful elimination of large established tumors and avoidance of antigen-loss variants by aggressive adoptive T cell immunotherapy. *Int. Immunol.* *15*, 797–805.
- Maziveyi, M., Dong, S., Baranwal, S., Mehrnezhad, A., Ratthinam, R., Huckaba, T.M., Mercante, D.E., Park, K., and Alahari, S.K. (2019). Exosomes from Nischarin-Expressing Cells Reduce Breast Cancer Cell Motility and tumor growth. *Cancer Res.*

- McNeel, D.G., Nguyen, L.D., Ellis, W.J., Higano, C.S., Lange, P.H., and Disis, M.L. (2001). Naturally occurring prostate cancer antigen-specific T cell responses of a Th1 phenotype can be detected in patients with prostate cancer. *Prostate* 47, 222–229.
- Medawar, P.B. (1957). *The Uniqueness of the Individual* (Basic Books).
- Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., Thatcher, N., Wagstaff, J., Zielinski, C., Faulkner, I., et al. (2014). Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 11, 509–524.
- Melief, C.J.M., Welters, M.J., Vergote, I., Kroep, J.R., Kenter, G.G., Ottevanger, N., Tjalma, W.A., Denys, H., Poelgeest, M. van, Nijman, H.W., et al. (2019). Abstract CT002: A strong HPV-specific T-cell response after chemo-immunotherapy for advanced cervical cancer is associated with prolonged survival. *Cancer Res* 79, CT002–CT002.
- Michalek, M.T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (1993). A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552–554.
- Michalek, M.T., Grant, E.P., and Rock, K.L. (1996). Chemical denaturation and modification of ovalbumin alters its dependence on ubiquitin conjugation for class I antigen presentation. *J. Immunol.* 157, 617–624.
- Milner, E., Barnea, E., Beer, I., and Admon, A. (2006). The turnover kinetics of major histocompatibility complex peptides of human cancer cells. *Mol. Cell Proteomics* 5, 357–365.
- Milner, E., Gutter-Kapon, L., Bassani-Strenberg, M., Barnea, E., Beer, I., and Admon, A. (2013). The Effect of Proteasome Inhibition on the Generation of the Human Leukocyte Antigen (HLA) Peptidome. *Mol Cell Proteomics* 12, 1853–1864.
- Mittendorf, E.A., Storrer, C.E., Shriver, C.D., Ponniah, S., and Peoples, G.E. (2006). Investigating the combination of trastuzumab and HER2/neu peptide vaccines for the treatment of breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 13, 1085–1098.
- Mommen, G.P.M., Frese, C.K., Meiring, H.D., Brink, J. van G. den, Jong, A.P.J.M. de, Els, C.A.C.M. van, and Heck, A.J.R. (2014). Expanding the detectable HLA peptide repertoire using electron-transfer/higher-energy collision dissociation (EThcD). *PNAS* 111, 4507–4512.
- Montealegre, S., and van Endert, P.M. (2019). Endocytic Recycling of MHC Class I Molecules in Non-professional Antigen Presenting and Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 9.

- Montealegre, S., Venugopalan, V., Fritzsche, S., Kulicke, C., Hein, Z., and Springer, S. (2015). Dissociation of  $\beta$ 2-microglobulin determines the surface quality control of major histocompatibility complex class I molecules. *FASEB J.* 29, 2780–2788.
- Morgan, R.A., Chinnasamy, N., Abate-Daga, D., Gros, A., Robbins, P.F., Zheng, Z., Dudley, M.E., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., et al. (2013). Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J. Immunother.* 36, 133–151.
- Morse, M.A., Hobeika, A.C., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyerly, H.K., and Clay, T.M. (2008). Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood* 112, 610–618.
- Murahashi, M., Hijikata, Y., Yamada, K., Tanaka, Y., Kishimoto, J., Inoue, H., Marumoto, T., Takahashi, A., Okazaki, T., Takeda, K., et al. (2016). Phase I clinical trial of a five-peptide cancer vaccine combined with cyclophosphamide in advanced solid tumors. *Clinical Immunology* 166–167, 48–58.
- Naik, S., Lulla, P., Tzannou, I., Vera, J.F., Gee, A.P., Krance, R.A., Brenner, M.K., Rooney, C.M., Gottschalk, S., and Leen, A.M. (2019). Adoptive T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia Targeting Multiple Tumor-Associated Antigens. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 25, S62–S63.
- Namy, O., Moran, S.J., Stuart, D.I., Gilbert, R.J.C., and Brierley, I. (2006). A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* 441, 244–247.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 473, 697–701.
- Neefjes, J., Gottfried, E., Roelse, J., Grommé, M., Obst, R., Hämmerling, G.J., and Momburg, F. (1995). Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *European Journal of Immunology* 25, 1133–1136.
- Neefjes, J., Jongasma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11, 823–836.
- Neefjes, J.J., Momburg, F., and Hammerling, G.J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261, 769–771.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J.W., Reits, E., Janssen, L., and Neefjes, J. (2005). Cross-

- presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434, 83–88.
- Nielsen, M., Lund, O., Buus, S., and Lundegaard, C. (2010). MHC Class II epitope predictive algorithms. *Immunology* 130, 319–328.
- Nijenhuis, M., and Hämmerling, G.J. (1996). Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J. Immunol.* 157, 5467–5477.
- Nishana, M., and Raghavan, S.C. (2012). Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology* 137, 271–281.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2, 213–219.
- Nordlund, J.J., Kirkwood, J.M., Forget, B.M., Milton, G., Albert, D.M., and Lerner, A.B. (1983). Vitiligo in patients with metastatic melanoma: a good prognostic sign. *J. Am. Acad. Dermatol.* 9, 689–696.
- O’Brien, K., Matlin, A.J., Lowell, A.M., and Moore, M.J. (2008). The biflavonoid isoginkgetin is a general inhibitor of Pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 283, 33147–33154.
- O’Donnell, T.J., Rubinsteyn, A., Bonsack, M., Riemer, A.B., Laserson, U., and Hammerbacher, J. (2018). MHCflurry: Open-Source Class I MHC Binding Affinity Prediction. *Cell Systems* 7, 129-132.e4.
- O’Hagan, D.T., and Valiante, N.M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2, 727–735.
- Oliveira, C.C., and van Hall, T. (2015). Alternative Antigen Processing for MHC Class I: Multiple Roads Lead to Rome. *Front. Immunol.* 6.
- Olson, B.M., and McNeel, D.G. (2012). Antigen loss and tumor-mediated immunosuppression facilitate tumor recurrence. *Expert Rev Vaccines* 11, 1315–1317.
- Olson, B.M., Frye, T.P., Johnson, L.E., Fong, L., Knutson, K.L., Disis, M.L., and McNeel, D.G. (2010). HLA-A2-restricted T-cell epitopes specific for prostatic acid phosphatase. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 943–953.
- Ortmann, B., Androlewicz, M.J., and Cresswell, P. (1994). MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368, 864–867.

- Ossendorp, F., Mengedé, E., Camps, M., Filius, R., and Melief, C.J. (1998). Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* *187*, 693–702.
- Ott, P.A., Henry, T., Baranda, S.J., Frleta, D., Manches, O., Bogunovic, D., and Bhardwaj, N. (2013). Inhibition of both BRAF and MEK in BRAF(V600E) mutant melanoma restores compromised dendritic cell (DC) function while having differential direct effects on DC properties. *Cancer Immunol. Immunother.* *62*, 811–822.
- Ott, P.A., Hu, Z., Keskin, D.B., Shukla, S.A., Sun, J., Bozym, D.J., Zhang, W., Luoma, A., Giobbie-Hurder, A., Peter, L., et al. (2017). An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* *547*, 217–221.
- Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (1998). Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* *160*, 1224–1232.
- Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *JCO* *27*, 5944–5951.
- Parker, K.C., Bednarek, M.A., Hull, L.K., Utz, U., Cunningham, B., Zweerink, H.J., Biddison, W.E., and Coligan, J.E. (1992). Sequence motifs important for peptide binding to the human MHC class I molecule, HLA-A2. *J. Immunol.* *149*, 3580–3587.
- Patthy, L. (2019). Exon skipping-rich transcriptomes of animals reflect the significance of exon-shuffling in metazoan proteome evolution. *Biol Direct* *14*.
- Pawellek, A., McElroy, S., Samatov, T., Mitchell, L., Woodland, A., Ryder, U., Gray, D., Lührmann, R., and Lamond, A.I. (2014). Identification of small molecule inhibitors of pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* *289*, 34683–34698.
- Perez, S., Zimet, G.D., Tatar, O., Stupiansky, N.W., Fisher, W.A., and Rosberger, Z. (2018). Human Papillomavirus Vaccines: Successes and Future Challenges. *Drugs* *78*, 1385–1396.
- Pfannenstiel, L.W., Diaz-Montero, C.M., Tian, Y.F., Scharpf, J., Ko, J.S., and Gastman, B.R. (2019). Immune-Checkpoint Blockade Opposes CD8<sup>+</sup> T-cell Suppression in Human and Murine Cancer. *Cancer Immunol Res* *7*, 510–525.
- Pham-Nguyen, K.B., Yang, W., Saxena, R., Thung, S.N., Woo, S.L.C., and Chen, S.-H. (1999). Role

- of NK and T cells in IL-12-induced anti-tumor response against hepatic colon carcinoma. *International Journal of Cancer* *81*, 813–819.
- Pickering, A.M., Koop, A.L., Teoh, C.Y., Ermak, G., Grune, T., and Davies, K.J.A. (2010). The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* *432*, 585–594.
- Pimentel, H., Conboy, J.G., and Pachter, L. (2015). Keep Me Around: Intron Retention Detection and Analysis. ArXiv:1510.00696 [q-Bio].
- Pleasance, E.D., Cheetham, R.K., Stephens, P.J., McBride, D.J., Humphray, S.J., Greenman, C.D., Varela, I., Lin, M.-L., Ordóñez, G.R., Bignell, G.R., et al. (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* *463*, 191–196.
- van Poelgeest, M.I.E., Welters, M.J.P., van Esch, E.M.G., Stynenbosch, L.F.M., Kerpershoek, G., van Persijn van Meerten, E.L., van den Hende, M., Löwik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Fathors, L.M., et al. (2013). HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *J Transl Med* *11*, 88.
- Prehn, R.T., and Main, J.M. (1957). Immunity to Methylcholanthrene-Induced Sarcomas. *J Natl Cancer Inst* *18*, 769–778.
- Prieto, P.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hughes, M.S., Kammula, U.S., White, D.E., Levy, C.L., Rosenberg, S.A., and Phan, G.Q. (2012). CTLA-4 Blockade with Ipilimumab: Long-Term Follow-up of 177 Patients with Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* *18*, 2039–2047.
- Purcell, A.W., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2007). More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov* *6*, 404–414.
- Quoix, E., Lena, H., Losonczy, G., Forget, F., Chouaid, C., Papai, Z., Gervais, R., Ottensmeier, C., Szczesna, A., Kazarnowicz, A., et al. (2016). TG4010 immunotherapy and first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (TIME): results from the phase 2b part of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Oncol.* *17*, 212–223.
- Radhakrishna, H., and Donaldson, J.G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J. Cell Biol.* *139*, 49–61.
- Rajasagi, M., Shukla, S.A., Fritsch, E.F., Keskin, D.B., DeLuca, D., Carmona, E., Zhang, W., Sougnez, C., Cibulskis, K., Sidney, J., et al. (2014). Systematic identification of personal tumor-

- specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *124*, 453–462.
- Rammensee, H.-G., Bachmann, J., and Stevanović, S. (1997). The Function. In *MHC Ligands and Peptide Motifs*, H.-G. Rammensee, J. Bachmann, and S. Stevanović, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 217–369.
- Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N.P.N., Bachor, O.A., and Stevanović, S. (1999). SYFPEITHI: Database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* *50*, 213–219.
- Rapoport, A.P., Stadtmauer, E.A., Binder-Scholl, G.K., Goloubeva, O., Vogl, D.T., Lacey, S.F., Badros, A.Z., Garfall, A., Weiss, B., Finklestein, J., et al. (2015). NY-ESO-1 specific TCR engineered T-cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* *21*, 914–921.
- Raule, M., Cerruti, F., Benaroudj, N., Migotti, R., Kikuchi, J., Bachi, A., Navon, A., Dittmar, G., and Cascio, P. (2014). PA28 $\alpha\beta$  reduces size and increases hydrophilicity of 20S immunoproteasome peptide products. *Chem. Biol.* *21*, 470–480.
- Raza, S., Safyan, R.A., and Lentzsch, S. (2017). Immunomodulatory Drugs (IMiDs) in Multiple Myeloma. *Curr Cancer Drug Targets* *17*, 846–857.
- Reid, D.W., and Nicchitta, C.V. (2012). The enduring enigma of nuclear translation. *J Cell Biol* *197*, 7–9.
- Reid, D.W., and Nicchitta, C.V. (2015). Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *16*, 221–231.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W., and Neefjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* *18*, 97–108.
- Reits, E.A., Vos, J.C., Grommé, M., and Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* *404*, 774–778.
- Ren, J., Liu, X., Fang, C., Jiang, S., June, C.H., and Zhao, Y. (2017). Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin. Cancer Res.* *23*, 2255–2266.
- Ressing, M.E., Sette, A., Brandt, R.M., Ruppert, J., Wentworth, P.A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H.M., Melief, C.J., and Kast, W.M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity

- studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J. Immunol.* *154*, 5934–5943.
- Reuben, A., Gittelman, R., Gao, J., Zhang, J., Yusko, E.C., Wu, C.-J., Emerson, R., Zhang, J., Tipton, C., Li, J., et al. (2017). TCR Repertoire Intratumor Heterogeneity in Localized Lung Adenocarcinomas: An Association with Predicted Neoantigen Heterogeneity and Postsurgical Recurrence. *Cancer Discov* *7*, 1088–1097.
- Riker, A.I., Kammula, U.S., Panelli, M.C., Wang, E., Ohnmacht, G.A., Steinberg, S.M., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M. (2000). Threshold levels of gene expression of the melanoma antigen gp100 correlate with tumor cell recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer* *86*, 818–826.
- Roa, I., de Toro, G., Schalper, K., de Aretxabala, X., Churi, C., and Javle, M. (2014). Overexpression of the HER2/neu Gene: A New Therapeutic Possibility for Patients With Advanced Gallbladder Cancer. *Gastrointest Cancer Res* *7*, 42–48.
- Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* *183*, 1185–1192.
- Robbins, P.F., Lu, Y.-C., El-Gamil, M., Li, Y.F., Gross, C., Gartner, J., Lin, J.C., Teer, J.K., Cliften, P., Tycksen, E., et al. (2013). Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat. Med.* *19*, 747–752.
- Robbins, P.F., Kassim, S.H., Tran, T.L.N., Crystal, J.S., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Yang, J.C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Sherry, R.M., et al. (2015). A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T cell receptor: Long term follow up and correlates with response. *Clin Cancer Res* *21*, 1019–1027.
- Robinson, T.O., and Schluns, K.S. (2017). The potential and promise of IL-15 in immuno-oncogenic therapies. *Immunol Lett* *190*, 159–168.
- Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of mhc class i-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 739–779.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* *78*, 761–771.
- Rock, K.L., Farfán-Arribas, D.J., Colbert, J.D., and Goldberg, A.L. (2014). MHC class I-presented

- peptides and the DRiP hypothesis. *Trends Immunol* 35, 144–152.
- Rock, K.L., Reits, E., and Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol* 37, 724–737.
- Roelse, J., Grommé, M., Momburg, F., Hämmerling, G., and Neefjes, J. (1994). Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J. Exp. Med.* 180, 1591–1597.
- Röpke, M., Hald, J., Guldborg, P., Zeuthen, J., Nørgaard, L., Fugger, L., Svejgaard, A., Burg, S.V.D., Nijman, H.W., Melief, C.J.M., et al. (1996). Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14704–14707.
- Rosalia, R.A., Quakkelaar, E.D., Redeker, A., Khan, S., Camps, M., Drijfhout, J.W., Silva, A.L., Jiskoot, W., Hall, T. van, Veelen, P.A. van, et al. (2013). Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European Journal of Immunology* 43, 2554–2565.
- Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., and White, D.E. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 1159–1166.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., et al. (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4, 321–327.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., et al. (2011). Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 17, 4550–4557.
- Rötzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., and Rammensee, H.-G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *European Journal of Immunology* 21, 2891–2894.
- Roulois, D., Grégoire, M., and Fonteneau, J.-F. (2013). MUC1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy: Induction and Challenge. *Biomed Res Int* 2013.

- Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C.P.M., Alou, M.T., Daillère, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M.P., et al. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 359, 91–97.
- Rozeman, E.A., and Blank, C.U. (2019). Combining checkpoint inhibition and targeted therapy in melanoma. *Nat Med* 25, 879–882.
- Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.-C., Barlow, A., and Janeway, C.A. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622–627.
- Ruella, M., and Kalos, M. (2014). Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunological Reviews* 257, 14–38.
- Ruiz-Cabello, F., Klein, E., and Garrido, F. (1991). MHC antigens on human tumors. *Immunol. Lett.* 29, 181–189.
- Rupp, L.J., Schumann, K., Roybal, K.T., Gate, R.E., Ye, C.J., Lim, W.A., and Marson, A. (2017). CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep* 7, 737.
- Rygaard, J., and Povlsen, C.O. (1974). The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 82, 99–106.
- Saccheri, F., Pozzi, C., Avogadri, F., Barozzi, S., Faretta, M., Fusi, P., and Rescigno, M. (2010). Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Sci Transl Med* 2, 44ra57.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103–114.
- Sampson, J.H., Archer, G.E., Mitchell, D.A., Heimberger, A.B., and Bigner, D.D. (2008). Tumor-specific immunotherapy targeting the EGFRvIII mutation in patients with malignant glioma. *Semin. Immunol.* 20, 267–275.
- Sarobe, P., Huarte, E., Lasarte, J.J., and Borrás-Cuesta, F. (2004). Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumor immune responses. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 443–454.
- Sarvaria, A., Madrigal, J.A., and Saudemont, A. (2017). B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 662–674.

- Saulquin, X., Scotet, E., Trautmann, L., Peyrat, M.-A., Halary, F., Bonneville, M., and Houssaint, E. (2002). +1 Frameshifting as a novel mechanism to generate a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope derived from human interleukin 10. *J. Exp. Med.* *195*, 353–358.
- Schaaf, M.B., Garg, A.D., and Agostinis, P. (2018). Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy. *Cell Death Dis* *9*, 115.
- Schneble, E.J., Berry, J.S., Trappey, F.A., Clifton, G.T., Ponniah, S., Mittendorf, E., and Peoples, G.E. (2014). The HER2 peptide nelipepimut-S (E75) vaccine (NeuVax™) in breast cancer patients at risk for recurrence: correlation of immunologic data with clinical response. *Immunotherapy* *6*, 519–531.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* *331*, 1565–1570.
- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* *404*, 770–774.
- Schuster, H., Peper, J.K., Bösmüller, H.-C., Röhle, K., Backert, L., Bilich, T., Ney, B., Löffler, M.W., Kowalewski, D.J., Trautwein, N., et al. (2017). The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, E9942–E9951.
- Schuster, H., Shao, W., Weiss, T., Pedrioli, P.G.A., Roth, P., Weller, M., Campbell, D.S., Deutsch, E.W., Moritz, R.L., Planz, O., et al. (2018). A tissue-based draft map of the murine MHC class I immunopeptidome. *Sci Data* *5*.
- Schwab, S.R., Li, K.C., Kang, C., and Shastri, N. (2003). Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules. *Science* *301*, 1367–1371.
- Schwab, S.R., Shugart, J.A., Horng, T., Malarkannan, S., and Shastri, N. (2004). Unanticipated antigens: translation initiation at CUG with leucine. *PLoS Biol.* *2*, e366.
- Seddigi, Z.S., Malik, M.S., Saraswati, A.P., Ahmed, S.A., Babalghith, A.O., Lamfon, H.A., and Kamal, A. (2017). Recent advances in combretastatin based derivatives and prodrugs as antimetabolic agents. *Medchemcomm* *8*, 1592–1603.
- Seidel, J.A., Otsuka, A., and Kabashima, K. (2018). Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol* *8*.
- Seifert, U., Marañón, C., Shmueli, A., Desoutter, J.-F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P.,

- Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., et al. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* *4*, 375–379.
- Seligmann, J.F., Elliott, F., Richman, S.D., Jacobs, B., Hemmings, G., Brown, S., Barrett, J.H., Tejpar, S., Quirke, P., and Seymour, M.T. (2016). Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* *2*, 633–642.
- Serda, R.E. (2013). Particle platforms for cancer immunotherapy. *Int J Nanomedicine* *8*, 1683–1696.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107–1111.
- Sharma, A., Bode, B., Studer, G., Moch, H., Okoniewski, M., Knuth, A., Boehmer, L. von, and Broek, M. van den (2013). Radiotherapy of Human Sarcoma Promotes an Intratumoral Immune Effector Signature. *Clin Cancer Res* *19*, 4843–4853.
- Sharp, F.A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O’Hagan, D.T., Pétrilli, V., Tschopp, J., et al. (2009). Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 870–875.
- Shastri, N., and Gonzalez, F. (1993). Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/Kb complex to T cells. *J. Immunol.* *150*, 2724–2736.
- Shaul, M.E., and Fridlender, Z.G. (2019). Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* *16*, 601–620.
- Shen, L., Orillion, A., and Pili, R. (2016). Histone deacetylase inhibitors as immunomodulators in cancer therapeutics. *Epigenomics* *8*, 415–428.
- Shepherd, J.C., Schumacher, T.N.M., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A., and Tonegawa, S. (1993). TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* *74*, 577–584.
- Shi, H., Han, X., Sun, Y., Shang, C., Wei, M., Ba, X., and Zeng, X. (2018a). Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 and CXCL2 produced by tumor promote the generation of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Sci.* *109*, 3826–3839.
- Shi, W., Dong, L., Sun, Q., Ding, H., Meng, J., and Dai, G. (2018b). Follicular helper T cells promote the effector functions of CD8 $^{+}$  T cells via the provision of IL-21, which is downregulated due to

- PD-1/PD-L1-mediated suppression in colorectal cancer. *Exp. Cell Res.* 372, 35–42.
- Shimonkevitz, R. (1983). Antigen recognition by H-2-restricted T cells. I. Cell-free antigen processing. *Journal of Experimental Medicine* 158, 303–316.
- Sijts, E.J. a. M., and Kloetzel, P.M. (2011). The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1491–1502.
- Sijts, A., Sun, Y., Janek, K., Kral, S., Paschen, A., Schadendorf, D., and Kloetzel, P.-M. (2002). The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol. Immunol.* 39, 165–169.
- Sikora, A.G., Jaffarzad, N., Hailemichael, Y., Gelbard, A., Stonier, S.W., Schluns, K.S., Frasca, L., Lou, Y., Liu, C., Andersson, H.A., et al. (2009). Interferon- $\alpha$  enhances peptide vaccine-induced CD8<sup>+</sup> T cell numbers, effector function, and anti-tumor activity. *J Immunol* 182, 7398–7407.
- Skwarczynski, M., and Toth, I. (2016). Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical Science* 7, 842–854.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182.
- van der Sluis, T.C., van Duikeren, S., Huppelschoten, S., Jordanova, E.S., Beyranvand Nejad, E., Sloots, A., Boon, L., Smit, V.T.H.B.M., Welters, M.J.P., Ossendorp, F., et al. (2015). Vaccine-induced tumor necrosis factor-producing T cells synergize with cisplatin to promote tumor cell death. *Clin. Cancer Res.* 21, 781–794.
- Smart, A.C., Margolis, C.A., Pimentel, H., He, M.X., Miao, D., Adeegbe, D., Fugmann, T., Wong, K.-K., and Van Allen, E.M. (2018). Intron retention is a source of neoepitopes in cancer. *Nature Biotechnology* 36, 1056–1058.
- Smith, M., García-Martínez, E., Pitter, M.R., Fucikova, J., Spisek, R., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2018). Trial Watch: Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy. *OncoImmunology* 7, e1526250.
- Snell, G.D. (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* 49, 87–108.
- Snell, G.D., Dausset, J., and Nathenson, S. (1976). CHAPTER 1 - ISOGRAFTS SUCCEED, ALLOGRAFTS FAIL. In *Histocompatibility*, G.D. Snell, J. Dausset, and S. Nathenson, eds. (Academic Press), pp. 1–9.

- Soares, K.C., Rucki, A.A., Wu, A.A., Olino, K., Xiao, Q., Chai, Y., Wamwea, A., Bigelow, E., Lutz, E., Liu, L., et al. (2015). PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T-cell infiltration into pancreatic tumors. *J. Immunother.* *38*, 1–11.
- Solomon, B.L., and Garrido-Laguna, I. (2018). TIGIT: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunol. Immunother.* *67*, 1659–1667.
- Spiliotis, E.T., Osorio, M., Zúñiga, M.C., and Edidin, M. (2000). Selective Export of MHC Class I Molecules from the ER after Their Dissociation from TAP. *Immunity* *13*, 841–851.
- Spiotto, M.T., Rowley, D.A., and Schreiber, H. (2004). Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nature Medicine* *10*, 294–298.
- Sprent, J., and Kishimoto, H. (2001). The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *356*, 609–616.
- Starck, S.R., and Shastri, N. (2011). Non-conventional sources of peptides presented by MHC class I. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 1471–1479.
- Starck, S.R., Jiang, V., Pavon-Eternod, M., Prasad, S., McCarthy, B., Pan, T., and Shastri, N. (2012). Leucine-tRNA Initiates at CUG Start Codons for Protein Synthesis and Presentation by MHC Class I. *Science* *336*, 1719–1723.
- Starck, S.R., Tsai, J.C., Chen, K., Shodiya, M., Wang, L., Yahiro, K., Martins-Green, M., Shastri, N., and Walter, P. (2016). Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science* *351*, aad3867.
- Stass, S., Mirro, J., Melvin, S., Pui, C.H., Murphy, S.B., and Williams, D. (1984). Lineage switch in acute leukemia. *Blood* *64*, 701–706.
- Steers, N.J., Currier, J.R., Jobe, O., Tovanabutra, S., Ratto-Kim, S., Marovich, M.A., Kim, J.H., Michael, N.L., Alving, C.R., and Rao, M. (2014). Designing the epitope flanking regions for optimal generation of CTL epitopes. *Vaccine* *32*, 3509–3516.
- Stillman, B.N., Hsu, D.K., Pang, M., Brewer, C.F., Johnson, P., Liu, F.-T., and Baum, L.G. (2006). Galectin-3 and Galectin-1 Bind Distinct Cell Surface Glycoprotein Receptors to Induce T Cell Death. *The Journal of Immunology* *176*, 778–789.
- Stintzing, S., Ivanova, B., Ricard, I., Jung, A., Kirchner, T., Tannapfel, A., Juetten, H., Hegewisch-Becker, S., Arnold, D., and Reinacher-Schick, A. (2018). Amphiregulin (AREG) and Epiregulin (EREG) Gene Expression as Predictor for Overall Survival (OS) in

- Oxaliplatin/Fluoropyrimidine Plus Bevacizumab Treated mCRC Patients—Analysis of the Phase III AIO KRK-0207 Trial. *Front Oncol* 8.
- Stone, J.D., Chervin, A.S., Aggen, D.H., and Kranz, D.M. (2012). T cell receptor engineering. *Meth. Enzymol.* 503, 189–222.
- Stranzl, T., Larsen, M.V., Lundegaard, C., and Nielsen, M. (2010). NetCTLpan: pan-specific MHC class I pathway epitope predictions. *Immunogenetics* 62, 357–368.
- Street, S.E., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192–197.
- Strønen, E., Toebe, M., Kelderman, S., Buuren, M.M. van, Yang, W., Rooij, N. van, Donia, M., Bösch, M.-L., Lund-Johansen, F., Olweus, J., et al. (2016). Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. *Science* 352, 1337–1341.
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183, 534–536.
- Suh, W.-K., Cohen-Doyle, M.F., Fruh, K., Wang, K., Peterson, P.A., and Williams, D.B. (1994). Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 264, 1322–1326.
- Sumimoto, H., Imabayashi, F., Iwata, T., and Kawakami, Y. (2006). The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J. Exp. Med.* 203, 1651–1656.
- Sundström, P., Szeponik, L., Ahlmann, F., Sundquist, M., Wong, J.S.B., Lindskog, E.B., Gustafsson, B., and Quiding-Järbrink, M. (2019). Tumor-infiltrating mucosal-associated invariant T (MAIT) cells retain expression of cytotoxic effector molecules. *Oncotarget* 10, 2810–2823.
- Takeuchi, H., Kuo, C., Morton, D.L., Wang, H.-J., and Hoon, D.S.B. (2003). Expression of Differentiation Melanoma-associated Antigen Genes Is Associated with Favorable Disease Outcome in Advanced-Stage Melanomas. *Cancer Res* 63, 441–448.
- Talmadge, J.E., and Gabrilovich, D.I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature Reviews Cancer* 13, 739–752.
- Tanahashi, N., Yokota, K., Ahn, J.Y., Chung, C.H., Fujiwara, T., Takahashi, E., DeMartino, G.N., Slaughter, C.A., Toyonaga, T., Yamamura, K., et al. (1997). Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and  $\gamma$ -interferon regulation. *Genes to Cells* 2, 195–

- Teng, M.W.L., Vesely, M.D., Duret, H., McLaughlin, N., Towne, J.E., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2012). Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res.* *72*, 3987–3996.
- Terabe, M., and Berzofsky, J.A. (2008). The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Adv Cancer Res* *101*, 277–348.
- Tesi, R.J. (2019). MDSC; the Most Important Cell You Have Never Heard Of. *Trends in Pharmacological Sciences* *40*, 4–7.
- Thaiss, C., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., and Kurts, C. (2011). Chemokines: A New Dendritic Cell Signal for T Cell Activation. *Frontiers in Immunology* *2*, 31.
- Togashi, Y., Shitara, K., and Nishikawa, H. (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* *16*, 356–371.
- Tokarew, N., Ogonek, J., Endres, S., Bergwelt-Baildon, M. von, and Kobold, S. (2019). Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer* *120*, 26–37.
- Townsend, A.R.M., Rothbard, J., Gotch, F.M., Bahadur, G., Wraith, D., and McMichael, A.J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* *44*, 959–968.
- Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P.F., Lu, Y.-C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Somerville, R.P., Hogan, K., Hinrichs, C.S., et al. (2014). Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* *344*, 641–645.
- Tran, E., Ahmadzadeh, M., Lu, Y.-C., Gros, A., Turcotte, S., Robbins, P.F., Gartner, J.J., Zheng, Z., Li, Y.F., Ray, S., et al. (2015). Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science* *350*, 1387–1390.
- Trincado, J.L., Entizne, J.C., Hysenaj, G., Singh, B., Skalic, M., Elliott, D.J., and Eyra, E. (2018). SUPPA2: fast, accurate, and uncertainty-aware differential splicing analysis across multiple conditions. *Genome Biology* *19*, 40.
- Tsalikis, J., Abdel-Nour, M., Farahvash, A., Sorbara, M.T., Poon, S., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2019). Isoginkgetin, a Natural Biflavonoid Proteasome Inhibitor, Sensitizes Cancer Cells to Apoptosis via Disruption of Lysosomal Homeostasis and Impaired Protein Clearance. *Mol Cell Biol* *39*.

- Turunen, J.J., Niemelä, E.H., Verma, B., and Frilander, M.J. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 61–76.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9, 1269–1274.
- Van den Eynde, B., Hainaut, P., Hérin, M., Knuth, A., Lemoine, C., Weynants, P., van der Bruggen, P., Fauchet, R., and Boon, T. (1989). Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int. J. Cancer* 44, 634–640.
- Vanzyl, E.J., Blackmore, A.B., Sayed, H., Rick, K.R.C., Fernando, P., and McKay, B.C. (2019). The spliceosome inhibitors isoginkgetin and pladienolide B induce ATF3-dependent cell death in mouse embryonic fibroblasts. *BioRxiv* 821363.
- Varshavsky, A. (1992). The N-end rule. *Cell* 69, 725–735.
- Verdegaal, E.M.E., Visser, M., Ramwadhoebé, T.H., van der Minne, C.E., van Steijn, J.A.Q.M.J., Kapiteijn, E., Haanen, J.B.A.G., van der Burg, S.H., Nortier, J.W.R., and Osanto, S. (2011). Successful treatment of metastatic melanoma by adoptive transfer of blood-derived polyclonal tumor-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in combination with low-dose interferon-alpha. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 953–963.
- Viatte, S., Alves, P.M., and Romero, P. (2006). Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles. *Immunol. Cell Biol.* 84, 318–330.
- Vigneron, N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int* 2015.
- Vinitsky, A., Antón, L.C., Snyder, H.L., Orłowski, M., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (1997). The generation of MHC class I-associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involvement of nonproteasomal cytosolic proteases in antigen processing? *J. Immunol.* 159, 554–564.
- Vita, R., Overton, J.A., Greenbaum, J.A., Ponomarenko, J., Clark, J.D., Cantrell, J.R., Wheeler, D.K., Gabbard, J.L., Hix, D., Sette, A., et al. (2015). The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res* 43, D405–D412.
- Vyas, M., Müller, R., and Pogge von Strandmann, E. (2017). Antigen Loss Variants: Catching Hold of Escaping Foes. *Front Immunol* 8.
- Wada, S., Jackson, C.M., Yoshimura, K., Yen, H.-R., Getnet, D., Harris, T.J., Goldberg, M.V., Bruno,

- T.C., Grosso, J.F., Durham, N., et al. (2013). Sequencing CTLA-4 blockade with cell-based immunotherapy for prostate cancer. *J Transl Med* 11, 89.
- Waight, J.D., Hu, Q., Miller, A., Liu, S., and Abrams, S.I. (2011). Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *PLoS ONE* 6, e27690.
- Waldmann, T.A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 595–601.
- Walker, C., Mojares, E., and del Río Hernández, A. (2018). Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci* 19.
- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.-Y., Mendrzyk, R., et al. (2012). Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.* 18, 1254–1261.
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., et al. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 8, 761–773.
- Wculek, S.K., Cueto, F.J., Mujal, A.M., Melero, I., Krummel, M.F., and Sancho, D. (2019). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 1–18.
- Weigert, R., Yeung, A.C., Li, J., and Donaldson, J.G. (2004). Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol. Biol. Cell* 15, 3758–3770.
- Welters, M.J., van der Sluis, T.C., van Meir, H., Loof, N.M., van Ham, V.J., van Duikeren, S., Santegoets, S.J., Arens, R., de Kam, M.L., Cohen, A.F., et al. (2016). Vaccination during myeloid cell depletion by cancer chemotherapy fosters robust T cell responses. *Sci Transl Med* 8, 334ra52.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12, 492–499.
- Wierecky, J., Müller, M.R., Wirths, S., Halder-Oehler, E., Dörfel, D., Schmidt, S.M., Häntschel, M., Brugger, W., Schröder, S., Horger, M.S., et al. (2006). Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res.* 66, 5910–5918.
- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and Memory CTL Differentiation. *Annual Review of Immunology* 25, 171–192.

- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281–1284.
- Wrzesinski, S.H., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 13, 5262–5270.
- Wu, Y., Xu, J., Du, C., Wu, Y., Xia, D., Lv, W., and Hu, J. (2019). The Predictive Value of Tumor Mutation Burden on Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol.* 9.
- Xing, Y., and Hogquist, K.A. (2012). T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Xue, L., Hu, Y., Wang, J., Liu, X., and Wang, X. (2019). T cells targeting multiple tumor-associated antigens as a postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Cancer Manag Res* 11, 6467–6476.
- Yadav, M., Jhunjhunwala, S., Phung, Q.T., Lupardus, P., Tanguay, J., Bumbaca, S., Franci, C., Cheung, T.K., Fritsche, J., Weinschenk, T., et al. (2014). Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 515, 572–576.
- Yáñez, L., Sánchez-Escamilla, M., and Perales, M.-A. (2019). CAR T Cell Toxicity: Current Management and Future Directions. *HemaSphere* 3, e186.
- Yang, B., Hahn, Y.S., Hahn, C.S., and Braciale, T.J. (1996). The requirement for proteasome activity class I major histocompatibility complex antigen presentation is dictated by the length of preprocessed antigen. *J. Exp. Med.* 183, 1545–1552.
- Yang, M., Antoine, D.J., Weemhoff, J.L., Jenkins, R.E., Farhood, A., Park, B.K., and Jaeschke, H. (2014). Biomarkers distinguish apoptotic and necrotic cell death during hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Liver Transpl.* 20, 1372–1382.
- Yarchoan, M., Johnson, B.A., Lutz, E.R., Laheru, D.A., and Jaffee, E.M. (2017). Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* 17, 209–222.
- Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E., and Greenberg, P.D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T

- cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 16168–16173.
- Yewdell, J.W., and David, A. (2013). Nuclear translation for immunosurveillance. *PNAS* *110*, 17612–17613.
- Yewdell, J.W., and Nicchitta, C.V. (2006). The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends in Immunology* *27*, 368–373.
- Yewdell, J.W., Antón, L.C., and Bennink, J.R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* *157*, 1823–1826.
- Yewdell, J.W., Reits, E., and Neefjes, J. (2003). Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* *3*, 952–961.
- Yewdell, J.W., Dersh, D., and Fåhraeus, R. (2019). Peptide Channeling: The Key to MHC Class I Immunosurveillance? *Trends in Cell Biology* *29*, 929–939.
- Yin, Y., Manoury, B., and Fåhraeus, R. (2003). Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science* *301*, 1371–1374.
- Yoon, S.-O., Shin, S., Lee, H.-J., Chun, H.-K., and Chung, A.-S. (2006). Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol Cancer Ther* *5*, 2666–2675.
- Yu, C., Liu, X., Yang, J., Zhang, M., Jin, H., Ma, X., and Shi, H. (2019). Combination of Immunotherapy With Targeted Therapy: Theory and Practice in Metastatic Melanoma. *Front. Immunol.* *10*.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., and Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* *188*, 2375–2380.
- Zhang, J., and Wang, L. (2019). The Emerging World of TCR-T Cell Trials Against Cancer: A Systematic Review. *Technol Cancer Res Treat* *18*.
- Zhang, J., Caruso, F.P., Sa, J.K., Justesen, S., Nam, D.-H., Sims, P., Ceccarelli, M., Lasorella, A., and Iavarone, A. (2019a). The combination of neoantigen quality and T lymphocyte infiltrates identifies glioblastomas with the longest survival. *Communications Biology* *2*, 1–10.
- Zhang, W., Young, A.C., Imarai, M., Nathenson, S.G., and Sacchettini, J.C. (1992). Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2Kb molecule containing a single viral

- peptide: implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 8403–8407.
- Zhang, X., Qi, Y., Zhang, Q., and Liu, W. (2019b). Application of mass spectrometry-based MHC immunopeptidome profiling in neoantigen identification for tumor immunotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *120*, 109542.
- Zhao, J., Chen, Y., Ding, Z.-Y., and Liu, J.-Y. (2019). Safety and Efficacy of Therapeutic Cancer Vaccines Alone or in Combination With Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Treatment. *Front Pharmacol* *10*.
- Zhao, Y., Niu, C., and Cui, J. (2018). Gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells: friend or foe in cancer development? *J Transl Med* *16*.
- Zhou, G., Drake, C.G., and Levitsky, H.I. (2006). Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood* *107*, 628–636.
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974a). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* *248*, 701–702.
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974b). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytes choriomeningitis. *Nature* *251*, 547–548.
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1975). H-2 compatability requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D; *J. Exp. Med.* *141*, 1427–1436.
- Zippelius, A., Pittet, M.J., Batard, P., Rufer, N., de Smedt, M., Guillaume, P., Ellefsen, K., Valmori, D., Liénard, D., Plum, J., et al. (2002). Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J. Exp. Med.* *195*, 485–494.
- Zitvogel, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* *140*, 798–804.

## **Annexe**

---

- 1. Article: « Isoginkgetin derivative IP2 enhances the adaptive immune response to tumor antigens »**

# **Isoginkgetin derivative IP2 enhances the adaptive immune response to tumor antigens**

Romain Darrigrand<sup>1\*</sup>, Alison Pierson<sup>1\*</sup>, Marine Rouillon<sup>1,2</sup>, Mathilde Boulpicante<sup>1</sup>, Dolor Renko<sup>3</sup>, Camille Garcia<sup>4</sup>, Michael Ghosh<sup>5</sup>, Marie-Charlotte Laignillon<sup>6</sup>, Camille Lobry<sup>6</sup>, Mouad Alami<sup>3</sup> and Sébastien Apcher<sup>1#</sup>.

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Inserm, Immunologie des tumeurs et Immunothérapie, 94805, Villejuif, France.

<sup>2</sup>SATT Paris Saclay, 91400 Orsay, France

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, CNRS, BioCIS, 92290, Châtenay-Malabry, France.

<sup>4</sup>Institut Jacques Monod, CNRS U7592 University Paris Diderot, 75013 Paris, France

<sup>5</sup>Department of Immunology, Interfaculty Institute for Cell Biology, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany

<sup>6</sup>Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Inserm, Hématopoïèse Normale et Pathologique, 94805, Villejuif, France.

\*These authors contributed equally to this work

#Corresponding Author: Sébastien Apcher, Gustave Roussy, University Paris Sud, University Paris Saclay, INSERM U1015, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France. Phone +(33)1 42 11 55 59, E-mail: sebastien.apcher@gustaveroussy.fr

"The authors declare no potential conflicts of interest."

**Running title:** A splicing inhibitor improves antitumor immune response and reshapes MHC-I immunopeptidome.

## **Abstract**

The success of cancer immunotherapy relies on the induction of an immunoprotective response targeting tumor antigens (TAs) presented by tumor cells on MHC class I (MHC-I) molecules. Non-conventional translation events have emerged as a rich source of TAs. Nuclear translation of unspliced mRNA generates for instance the Pioneer Translation Products. We demonstrated *in vitro* and *in vivo* that the splicing inhibitor isoginkgetin and its water-soluble and non-toxic derivative IP2 act at the production stage of the PTPs. We showed that IP2 increases PTP-derived antigen presentation in cancer cells *in vitro* and impairs tumor growth *in vivo*. IP2 action is long-lasting and dependent on the CD8<sup>+</sup> T cell response to tumor antigens. Finally, we observed that the antigen repertoire displayed on MHC-I molecules at the surface of cancer cells is modified upon treatment with IP2. Not only this newly discovered immunomodulatory agent alters the presentation of pre-existing epitopes but it induce the emergence of novel antigens derived from both coding and allegedly non-coding sequences.

## **Significance**

The success of cancer immunotherapy highlights the importance of evaluating the production of MHC-I peptide ligands and the different ways that tumor cells used to evade immunosurveillance. We have shown that Pioneer Translation Products (PTPs) production can be induced by spliceosome inhibitors which reshape the MHC-I immunopeptidome of cancer cells. These findings identify the spliceosome as a druggable target to enhance cancer immunosurveillance.

## **Introduction**

All nucleated cells of jawed vertebrates present antigenic peptides (APs) at their surface through the major histocompatibility complex class I (MHC-I) presentation pathway. MHC-I peptides (MIPs) are 8- to 12- amino acid long and reflect the inherent metabolic cellular activity (1). Initial clinical trials using vaccines targeting tumor antigens (TA) have not met expectations. The main failures have been associated with immunosuppressive mechanisms and with a suboptimal choice of antigens (2,3). One of the important events that drives tumor immunoselection and is correlated with a poor prognosis is the loss or the downregulation of MHC-I antigen presentation by tumor cells (4,5). The latter can escape cytotoxic T lymphocyte (CTL) and natural killer (NK) cell recognition thanks to defects in the components of the MHC-I presentation pathway (6). Moreover, along with the overall decrease in MHC-I antigen presentation, the very nature and the amount of antigens presented at the cell surface, namely the MHC-I immunopeptidome, is of critical importance for immune recognition. For example, the loss of expression at the tumor cell surface of a specific TA identified and targeted with immunotherapy, such as Her/neu in breast cancer or CEA in colon cancer, leads to immune evasion (7,8). To counter this phenomenon, current strategies aim at enlarging the range of targeted tumor antigens and restoring MHC-I antigen presentation (9-12).

In order to understand the dynamics of the MHC-I immunopeptidome, we focused on the source of APs for the MHC-I presentation pathway. Exploring the concept of Defective Ribosomal Products (DRIPs) (13-16), we showed that one of the most important sources of APs is a pioneer translation event that occurs on pre-mRNAs, before introns are spliced out, and independently of the translation of the corresponding full length proteins. Non-canonical peptides produced through this event can therefore derive from intronic sequences, 3' or 5' UTR regions as well as alternative reading frames. These polypeptides are described as Pioneer Translation Products (PTPs) (17,18). The discovery of PTPs emphasizes the existence of a nuclear translational mechanism of precursor mRNAs that participates in the production of MHC-I peptides (MIPs). Moreover, PTPs play a role in the dynamic of cancer development. When inoculated into mice, it has been shown that cancer cells presenting PTP-derived antigens at their surface can be recognized by specific T cells leading to tumor growth reduction. Besides, purified PTPs containing a model epitope efficiently promote anti-cancer immune response when injected as a peptide vaccine into mice (19).

Cancer therapy has been constantly evolving with the hope of finding the most effective agents to eradicate tumors with the least toxic effects on healthy tissues. Various

approaches have been implemented in cancer therapy including surgery, radiation, chemotherapy and targeted therapy. The continuous process of research has shifted the focus in the last century toward immunotherapy as a novel tool for fighting cancer. This attractive strategy proved to be effective in positively changing the landscape of the management of many advanced solid tumors. Unlike conventional cancer treatments that kill tumor cells, immunotherapy targets the immune system to strengthen and stimulate the patient's own defenses against cancer cells. This approach has made it possible to develop monoclonal antibodies called "immunomodulators" such as anti-CTLA-4 (e.g. ipilimumab) or anti-PD-1/PD-L1 (e.g. nivolumab). These checkpoint inhibitors have shown unprecedented responses in subsets of patients with advanced melanoma and non-small cell lung cancer (20,21). Although numerous efforts have been made to develop small molecules with immunomodulatory properties for cancer treatment, only thalidomide and its derivatives have been described as immunomodulatory small molecules for the treatment of multiple myeloma to date (22). Although these drugs are used in clinic, they come with several drawbacks, mainly a teratogenic effect, considerably limiting their use.

The biflavonoid isoginkgetin is a natural compound extracted from the leaves of the *Ginkgo biloba* tree. Multiple properties of the molecule have been reported and associated with its antitumor activity. Isoginkgetin was first shown to inhibit tumor cell invasion by inhibiting the production of the matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) (23). Indeed, isoginkgetin-induced downregulation of the NF- $\kappa$ B pathway leads to the upregulation of the MMP-9 inhibitor (TIMP-1) in human fibrosarcoma. More recently, it has been demonstrated that isoginkgetin inhibits 20S proteasome activity and induces a toxic accumulation of polyubiquitinated proteins (24). Eventually, isoginkgetin was described as a general inhibitor of precursor-mRNA (pre-mRNA) splicing which stalls spliceosome assembly at the prespliceosomal A complex (25). Pre-mRNA splicing is catalyzed in the nucleus by the spliceosome, a conserved and dynamic multi-RNA/protein complex composed of five small nuclear RNAs (snRNAs) in interaction with over 180 proteins (26). A growing number of studies report that the deregulation of the spliceosome complex entails aberrant splicing patterns in many cancers contributing to abnormal tumor cell proliferation and progression (27-30). Furthermore, cancer cells have different intracellular mechanisms to shape the pool of peptides presented on MHC-I molecules at their surface, leading to the reduction of their immunogenicity and allowing them to escape from T-cell recognition (6,31). In a recent study, we observed that splicing inhibition positively modulate the surface presentation of a

PTP-derived model antigen in healthy cells treating with isoginkgetin (18). Since 2011, recurrent spliceosome mutations have been reported in several cancers. Among strategies developed to render tumor cells more visible to CTL, a novel class of anti-cancer molecules has been of particular interest for us: the splicing inhibitors (27). Several natural products and their synthetic analogues have been reported to inhibit the spliceosome, including pladienolides B and D, spliceostatin A, FR901464, E7107, isoginkgetin and madrasin.

Here we show that the biflavonoid isoginkgetin and the water-soluble derivative IP2 we generated enhance the presentation of PTP-derived antigens at the surface of cancer cells *in vitro*. In addition, IP2 induces a long-lasting anti-cancer immune response *in vivo*. Finally, IP2 was shown to re shape the MHC-I immunopeptidome, leading to a new peptide representation at the cell surface. Our findings shed light on a new immunomodulatory agent whose antitumor activity relies on the increase in the presentation of antigens from non-conventional sources at the cancer cell surface.

## Results

### **Splicing inhibitor isoginkgetin increases exon- and intron-derived SL8 presentation in cancer cells *in vitro* and inhibits the growth of SL8-expressing tumor *in vivo* in an immune-dependent manner.**

In order to improve the antigenicity of cancer cells and thus their recognition by the immune system, we determined whether isoginkgetin was able to modulate positively the expression and the presentation of tumor-associated PTP-derived antigens at the surface of cancer cells. For that purpose, the murine MCA205 sarcoma and B16F10 melanoma transiently expressing the intron-derived SL8 epitope within the  $\beta$ -Globin gene construct (Globin-SL8-intron) were treated with increasing doses of isoginkgetin. The highest dose tested is around the IC<sub>50</sub> of isoginkgetin for MCA205 cells and the IC<sub>25</sub> for B16F10 cells (Supplementary Fig. S1A). In accordance with our previous study, isoginkgetin elicited an increase in the intron-derived SL8 antigen presentation, in a dose dependent manner (Fig. 1A). To further investigate the impact of isoginkgetin on PTP presentation, MCA205 and B16F10 cell lines transiently expressing the exon-derived SL8 epitope within the  $\beta$ -Globin gene construct (Globin-SL8-exon) or the splicing independent OVA cDNA (OVA-derived SL8) were treated with increasing doses of the compound. We observed that isoginkgetin increases splicing-dependent but not splicing-independent SL8 presentation in a dose dependent manner (Figs. 1B and 1C). Furthermore, we observed that the expression of the MHC-I H-2K<sup>b</sup> molecules at the cell surface is affected upon treatment with isoginkgetin in a

different manner depending on the cell type (Supplementary Fig. S1B). Those variations are therefore not correlated with the effect of the compound on the SL8 antigen presentation *in vitro*. Overall, these results show that the natural product isoginkgetin acts as an enhancer of the PTP-derived antigen presentation in cancer cells independently of the epitope setting (i.e. in exonic or in intronic sequences) or the cell type. Moreover, they support the idea that pre-mRNAs are a source for antigen presentation when the spliced machinery is impaired. This suggests an action of isoginkgetin during the production stage of PTPs and not downstream in the MHC-I antigen presentation pathway.

Antigen abundance at the cell surface has been demonstrated to be a key parameter in determining the magnitude of the CD8<sup>+</sup> T cell response and hence in defining immunodominance (33). Therefore, we assessed the effect of isoginkgetin treatment on the antitumor response to tumors expressing the immunodominant SL8 epitope *in vivo*. MCA205 sarcoma cells and B16F10 melanoma cells stably expressing the Globin-SL8-intron construct were inoculated subcutaneously into C57BL/6 mice. At days 5, 10 and 15 post tumor inoculation, the mice were injected intraperitoneally with 18 mg/kg of isoginkgetin and the tumor growth was monitored. We observed a 60% decrease in the growth of MCA205 globin-SL8-intron at day 27 (Fig. 1D and Supplementary Fig. 1C, left panels) and a 30% decrease in the growth of B16F10 globin-SL8-intron tumors at day 18 (Fig. 1D and Supplementary Fig. 1C, right panels) in isoginkgetin-treated mice. To assess the link between SL8 overexpression and tumor growth reduction *in vivo* after isoginkgetin treatment, we performed the same experiment in mice inoculated with either MCA205 or B16F10 wild type (WT) cells. No significant reduction in the growth of MCA205 WT (Fig. 1E and Supplementary Fig. S1D, left panels) and B16F10 WT (Fig. 1E and Supplementary Fig. S1D, right panels) was observed after treatment with 18mg/kg of isoginkgetin. Taken together, these results show that the isoginkgetin-induced increase in PTP presentation and tumor growth reduction are mediated by the effect of the compound on the splicing of the immunodominant SL8 epitope.

We then assessed the requirement of the immune system for isoginkgetin to reduce tumor growth. Immunodeficient Nu/Nu nude mice were injected subcutaneously with either MCA205 or B16F10 cells stably expressing the Globin-SL8-intron construct or WT cells and thereafter treated under the conditions previously stated. No effect of isoginkgetin treatment was observed on the growth of each of the four tumor types in nude mice (Figs. 1F and 1G and Supplementary Figs. S1E and S1F).

Eventually, these results show that isoginkgetin enhances the presentation of both exon-derived and intron-derived antigens in cancer cells. They also demonstrate that

isoginkgetin action relies on splicing events affecting immunodominant epitopes and is dependent on the adaptive immune system.

**The derivative IP2 retains the properties of the parent isoginkgetin on antigen presentation with reduced cytotoxicity.**

Two intrinsic properties of the isoginkgetin compound are limiting its further use in pre-clinical or clinical studies. Indeed, the molecule is cytotoxic for both normal and cancer cells and its high hydrophobicity reduces its bioavailability. Therefore, water-soluble derivatives of the natural isoginkgetin product were tested for their ability to increase PTP-derived antigen presentation *in vitro*.

The derivatives IP2 and M2P2 were synthesized from the commercial isoginkgetin compound (Supplementary Fig. S2). In short, the synthesis of IP2 (referred as compound 2 in the schematic) was accomplished by the phosphorylation of isoginkgetin employing *in situ* formation of diethylchlorophosphite to provide compound 1. Further cleavage of the ethyl ester protective groups with iodotrimethylsilane afforded the phosphoric acid intermediate, which was immediately treated with sodium hydroxide to complete a practical route to the disodium phosphate prodrug. For the synthesis of the M2P2 molecule, the remaining two phenol groups of compound 1 were alkylated using methyl iodide to furnish compound 3. Treatment of the latter under similar conditions to prepare compound 2 from compound 1 gave the disodium phosphate prodrug 4 or M2P2, whereas its reaction under basic conditions provided compound 5. The water solubility of IP2 and M2P2 was found to be considerably higher than that of the parent compound isoginkgetin (data not shown).

IP2 and M2P2 compounds were first tested for their ability to increase the MHC-I presentation of PTP-derived antigens *in vitro*. For that purpose, MCA205 and B16F10 cells transiently expressing the Globin-SL8-intron construct were treated with 15 $\mu$ M or 35 $\mu$ M of IP2 or M2P2 for 18h. While treatment with IP2 increases the intron-derived SL8 presentation in both MCA205 and B16F10 cells, as observed with isoginkgetin, M2P2 decreases its presentation in MCA205 cells and does not impact it in B16F10 cells (Fig 2A). In contrast, the alkylating agent cyclophosphamide has no effect on antigen presentation in both cell lines and the antimetabolite gemcitabine only acts on MCA205 cells (Supplementary Fig. S3A). In parallel, we showed that neither the expression of H-2K<sup>b</sup> molecules at the cell surface at steady state (Fig. 2B) nor the recovery of H-2K<sup>b</sup> molecules at the cell surface after acid strip (Supplementary Fig. S3B) were affected by the treatment with IP2 or M2P2. Taken together, those results suggest a specificity of action of the isoginkgetin derivative IP2 on antigen

presentation that is not shared with molecules with other activities and that does not rely on increased number of MHC-I molecules at the cell surface.

Furthermore, we observed by MTT assay that IP2 compound displays no toxicity toward MCA205 and B16F10 cells in a wide range of concentrations (Supplementary Fig. S3C). More specifically, IP2 treatment does not induce tumor cell apoptosis up to 1 mM as assessed by flow cytometry after Annexin V/DAPI double staining (Fig. 2C). IP2 derivative is thus more suitable for *in vivo* studies than the parent isoginkgetin.

To further assess the properties of the derivative IP2 in comparison with the parent isoginkgetin, we performed a RNA-seq followed by a differential gene expression analysis on MCA205 and B16F10 cells treated for 18h with 35  $\mu$ M of IP2 or 15  $\mu$ M of isoginkgetin. We observed that IP2 impacts the expression of a highly reduced number of genes compared to the parent natural product isoginkgetin which may explain its lack of toxicity (Fig. 2D). In addition, we assessed the effect of IP2 on alternative splicing. We first showed by quantitative RT-PCR that IP2 treatment in MCA205 and B16F10 cells increases the amount of unspliced pre-mRNA containing the Globin-SL8-intron sequence, as does isoginkgetin treatment (Supplementary Fig. S3D). More generally, a differential splicing analysis performed from RNA-seq data revealed that isoginkgetin and IP2 induce similar but not identical splicing patterns in MCA205 and B16F10 (Supplementary Fig. S3E). In particular, about 30% of alternative splicing events induced by IP2 in MCA205 cells are similarly induced by isoginkgetin on the same cells. This proportion even reaches 70% in B16F10 cells.

All together, these results show that the compound IP2 is a water-soluble and non-toxic derivative of the natural product isoginkgetin. Importantly, the chemical modifications made to the original compound did not alter its positive effect on antigen presentation. Besides, IP2 and isoginkgetin are both splicing inhibitors but they may have different specificities of action.

### **IP2 treatment reduces tumor growth and extends survival.**

The derivative IP2, but not the derivative M2P2, enhances antigen presentation *in vitro*. We next assessed their antitumor activity *in vivo*. To this end, MCA205 and B16F10 tumor cells stably expressing the Globin-SL8-intron construct or WT were subcutaneously inoculated into C57BL/6 mice as previously described. At day 5, 10 and 15 post tumor inoculation, each group of mice was intraperitoneally treated with 18mg/kg of isoginkgetin, IP2 or M2P2. At this dose, a significant decrease in MCA205 globin-SL8-intron tumor growth was observed after treatment with IP2, slightly higher than that induced by

isoginkgetin treatment, while no impact of M2P2 treatment was noticed (Fig. 3A and Supplementary Fig. S4A, left panels). In addition, the reduction in B16F10 globin-SL8-intron tumor growth was similar after treatment with 18mg/kg of isoginkgetin or 18mg/kg of IP2, while M2P2 had no effect (Fig. 3A and Supplementary Fig. S4A, right panels). Since we were not limited by IP2 solubility in water, we tried to increase the dose injected into mice in order to achieve a greater reduction of tumor growth. Increasing the dose of IP2 to 36 mg/kg did improve the antitumor effect on B16F10 Globin-SL8-intron but it has no effect on MCA205 globin-SL8-intron (Fig. 3A and Supplementary Fig. S4A). Strikingly, IP2 treatment slowed down the growth of both MCA205 WT and B16F10 WT tumors while isoginkgetin and M2P2 treatments did not affect the growth of any WT tumor (Fig. 3B and Supplementary Fig. S4B). More specifically, we observed a 40% to 60% decrease in MCA205 WT sarcoma growth (Fig. 3B and Supplementary Fig.S4B, left panels) and a 40% decrease in B16F10 WT melanoma growth (Fig. 3B and Supplementary Fig.S4B, right panels). Furthermore, IP2 treatment extends overall survival with about 60% of mice bearing MCA205 globin-SL8-intron tumors that experience complete tumor regression upon treatment with 18 mg/kg of IP2 versus 30% with 18 mg/kg of isoginkgetin (Fig. 3C).

Mice that were cured after treatment with IP2 or isoginkgetin were re-challenged with tumor cells about three months after first injection. They received MCA205 Globin-SL8-intron cells in the ipsilateral flank and B16F10 WT cells in the contralateral flank. Without further treatment with one of the splicing inhibitors, mice did not develop MCA205 Globin-SL8-intron tumors while B16F10 WT tumors grew over time (Fig. 3D). This result demonstrates that mice developed a long term antitumor response against SL8-expressing tumors after treatment with isoginkgetin or IP2.

To further support the idea that IP2 has a strong antitumor activity, we evaluated the ability of the compound to treat established tumors. Mice were inoculated with either  $2 \times 10^5$  MCA205 Globin-SL8-intron or  $2 \times 10^5$  MCA205 WT tumor cells and treatment was initiated when tumor size had reached 30mm<sup>2</sup>. Mice were then treated intraperitoneally with 30 mg/kg of IP2 every three days for a total of 4 injections. In that setting, we observed a 60% reduction of MCA205 globin-SL8-intron tumor size at day 26 after challenge (Fig. 3E and Supplementary Fig. S4C, left panels) and a 35% reduction of MCA205 WT tumor size at day 22 after challenge (Fig. 3E and Supplementary Fig. S4C, right panels).

Overall, these results suggest a correlation between the increase in PTP-derived antigen presentation observed *in vitro* and the reduction of the tumor growth *in vivo* upon treatment. Interestingly, unlike isoginkgetin, IP2 treatment slows down the growth of tumors

that do not bear the highly immunodominant SL8 epitope. This difference of efficacy between the two molecules can be due to their different biodisponibility, which should be higher for the water-soluble IP2 molecule than for the hydrophobic isoginkgetin. We suggest that the derivative IP2 is able to induce immunogenic epitope at the surface of cancer cell, driving the antitumor response.

### **IP2 therapeutic effect is dependent on the adaptive immune response.**

We have observed that IP2 therapeutic effect is stronger against tumors expressing an immunodominant epitope. Therefore, we assessed the requirement of an effective immune system and especially T cell responses for IP2 to exert its antitumor activity. MCA205 and B16F10 tumor cells stably expressing the Globin-SL8-intron construct or WT were subcutaneously inoculated into Nu/Nu athymic nude mice that lack T cells but not B and NK cells. At day 5, 10 and 15 post tumor inoculation, each group of mice was treated intraperitoneally with the dose of IP2 which was found to be the most efficient in immunocompetent mice. We observed that IP2 impacts the growth of none of the tumor models in immunodeficient nude mice (Fig. 4A and 4B). In addition, we further assessed the specific role of CD8<sup>+</sup> T cells in IP2 action by depleting this population *in vivo* with an anti-CD8 T cell monoclonal antibody. Mice were subcutaneously inoculated with MCA205 Globin-SL8-intron or WT cells and thereafter treated with depleting anti-CD8 T cell antibody or with the isotype control. IP2 treatment was administered as previously at day 5, 10 and 15 post tumor inoculation. Interestingly, CD8<sup>+</sup> T cell depletion completely abrogated the antitumor effect of the IP2 treatment (Fig. 4C). Therefore, this result confirms that the effect of IP2 treatment on tumor growth is dependent on the CD8<sup>+</sup> T cell response which supports an antigen-driven cytotoxic activity against the tumor cells.

We then determined the effect of IP2 treatment on the CD8<sup>+</sup> T cell population *in vivo*. For this purpose, SL8-specific OT-1 T cells were adoptively transferred into C57BL/6 mice that were previously inoculated with MCA205 tumor cells stably expressing the Globin-SL8-intron construct and treated twice with 24 mg/kg of IP2. Three days after the adoptive transfer, proliferation and expansion of SL8-specific CD8<sup>+</sup> T cells was measured by flow cytometry using a SL8/H-2K<sup>b</sup> dextramer. Interestingly, we observed a two-fold increase in SL8-specific CD8<sup>+</sup> T cells in mice that had been treated with IP2 prior to adoptive transfer of OT-1 cells (Fig. 4D).

Overall these results shed light on the capacity of the derivative IP2 to positively modulate the antitumor immune response. In addition, they indicate that IP2 treatment

induces *in vivo* the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells directed against tumor antigens.

**IP2 treatment alters the MHC-I immunopeptidome of tumor cells and modifies the presentation of both conventional and non-conventional MIPs.**

To confirm that the enhanced immune response observed after treatment with IP2 results from a change in cancer cell immunogenicity, we analyzed the repertoire of peptides displayed at the cancer cell surface upon treatment. MCA205 and B16F10 cells were cultured with or without IP2 and peptides eluted from H-2K<sup>b</sup> and H-2D<sup>b</sup> molecules after immunoprecipitation were sequenced by mass spectrometry. To identify peptides derived from both canonical and non-canonical sources, we built personalized databases following pipelines available in the literature. A first database was generated to identify retained-intron derived epitope thanks to the bioinformatics tool “keep me around” (34). This database was concatenated with the mouse reference proteome extracted from Uniprot to build a “Retained Introns + Uniprot” database. In parallel, we performed an all-frames translation of the cancer cell lines transcriptomes and generated an “All Frame” database according to a previously described pipeline (35). First, a qualitative analysis revealed that there was a significant change in the length of peptides presented at the surface of B16F10 cells after treatment with IP2 with 8-mers and 9-mers being enriched at the expense of both 11-mers and 12-mers. We then observed that the MHC-I immunopeptidome of both MCA205 and B16F10 cells was altered after treatment with IP2. We identified on the “Retained Intron + Uniprot” database peptides whose presentation at the surface of MCA205 (Fig. 5C and 5D) and B16F10 (Fig. 5E and 5F) cells in H-2K<sup>b</sup> (left panels) or H-2D<sup>b</sup> molecules (right panels) was significantly modified after treatment. The same observation was made from the “All Frame” database for peptides whose presentation at the surface of MCA205 (Fig. S5A and S5B) and B16F10 (Fig. S5C and S5D) cells in H-2K<sup>b</sup> (left panels) or H-2D<sup>b</sup> molecules (right panels) was significantly modified after treatment. Interestingly, we found peptides from exonic sequences which have been already described in the immune epitope database IEDB but also peptides derived from retained introns and allegedly non-coding sequences such as introns, intergenic DNA or cis-regulatory elements (Supplementary Tables 1 to 4). This result confirms that retained introns can be a source of peptides for the MHC I presentation pathway (34) and that allegedly non-coding regions of the genome can play a role in tumor cell immunogenicity (35). In addition to endogenous peptides whose presentation is enriched at the surface of cancer cells after treatment, we found peptides presented exclusively by IP2-treated MCA205 cells (Table 1, upper table) and IP2-treated B16F10 cells (Table 1, lower table). Those peptides constitute

therefore IP2-induced neoantigens. Here again, we found peptides derived from both coding and allegedly non-coding sequences. Interestingly, IP2 induces the presentation of tumor-specific mutated epitopes highlighted in bold in the tables (Table 1 and Supplementary Table 1 to 4).

Taken together those results show that IP2 re shapes the MHC-I immunopeptidome of cancer cells and induces the presentation of a new repertoire of epitopes which may promote tumor recognition by the immune system and its subsequent eradication.

### **Vaccination with IP2-induced peptides generates reactive CD8<sup>+</sup> T cells.**

Our mass spectrometry-based peptidomics approach enabled the identification of epitopes overexpressed at the surface of cancer cells upon treatment with IP2 and neoepitopes specific for IP2-treated cells. We next sought to determine the immunogenicity of those IP2-induced peptides in order to include them in vaccination strategies. For each epitope, a 39-amino acid long synthetic long peptide (SLP) was produced with the epitope in a central position. SLPs were pooled by three in immunization pools whose immunogenicity was assessed by an ELISpot IFN $\gamma$ . Composition of each immunization pool is available in Supplementary Table 5. C57BL/6 mice were vaccinated with the immunization pools and one week later the frequencies of IFN $\gamma$ -secreting CD8<sup>+</sup> T cells in the spleens were measured. We identified reactive CD8<sup>+</sup> T cells against MCA205 immunization pools 2, 3 and 9 (Fig. 6A, left panel) and B16F10 immunization pools 14 and 15 (Fig. 6A, right panel). MCA205 immunization pool 10 which showed negative results was kept for further analysis because it contains the SLP MCA205 KB-22 which encompasses the same epitope as the SLP MCA205 KB-1 in pool 9 but different flanking regions (Supplementary Fig. S6A). We then performed the deconvolution of immunization pools to identify which epitope(s) is(are) responsible for the CD8<sup>+</sup> T cell reactivity within each pool. An ELISPOT IFN $\gamma$  post vaccination with immunization pools or individual peptides was performed and showed that MCA205 KB-16 in pool 2, MCA205 KB-10 in pool 3 (Fig. 6C, left panel and Supplementary Fig. S6B) and B16F10 KB-5 in pool 14 (Fig. 6C, right panel) were immunogenic. To confirm and refine this selection, the ELISPOT IFN $\gamma$  assays were supplemented with ELISA IL-2 assays to measure CD8<sup>+</sup> activation in two distinct ways. Significant concentrations of IL-2 were detected upon stimulation of CD8<sup>+</sup> T cells with BMDCs pulsed with MCA205 KB-16 in pool 2, MCA205 KB-10 in pool 3, MCA205 KB-1 in pool 9, MCA205 KB-22 in pool 22 (Fig. 6D, left panel) and B16F10 KB-5 in pool 14 (Fig. 6D, right panel). Peptides from B16F10 immunization

pool 15 were found to be equally immunogenic by ELISPOT IFN $\gamma$  and ELISA IL-2 assays (Fig 6C and 6D, right panels and Supplementary Fig. S6C).

Eventually, we show with two distinct immunoassays that the vaccination with IP2-induced peptides can elicit a CD8<sup>+</sup> T cell response *in vivo*. Importantly, peptides derived from both coding and allegedly non-coding sequences were found to be immunogenic.

### **Combinations of IP2 with prophylactic or therapeutic peptide vaccines inhibit tumor growth.**

We have identified immunogenic epitopes at the surface of MCA205 and B16F10 cells upon treatment with IP2. One of them derives from an exon but the others originate from non-conventional source of MIPs such as introns and enhancer regions. Thereafter, we assessed their antitumor potential in the context of prophylactic and therapeutic cancer vaccines in combination with IP2. In the prophylactic setting, mice were vaccinated twice with 100  $\mu$ g of the SLPs encompassing the IP2-induced epitopes, then challenged subcutaneously with tumor cells and finally treated intraperitoneally with IP2 (Fig. 7A). Vaccination with the SLPs without consecutive treatment with IP2 had no effect on the growth of MCA205 (Fig. 7B) and B16F10 (Fig. 7C) tumors. Indeed, although the vaccination can elicit reactive CD8<sup>+</sup> T cells, IP2 treatment is required to induce the expression of the epitope at the cancer cell surface and therefore trigger their recognition and killing. However, the SLPs MCA205 KB-16 and MCA205 KB-1 inhibited the growth of MCA205 tumors when combined with IP2 while the combination of IP2 with the SLP MCA205 KB-10 had no effect (Fig. 7B). This result highlights the importance of the choice of the epitope targeted in the peptide vaccine not to misdirect the immune response and, here, abrogate the immunomodulatory effect of IP2 treatment. Similar results were observed in the B16F10 tumor model where the combination of the SLP B16F10 DB-2 with IP2 had an antitumor effect while the combinations with B16F10 DB-1 and B16F10 DB-2 were ineffective (Fig. 7C). The antitumor effect of the SLPs combined with IP2 was also assessed in a therapeutic setting in the MCA205 model. Mice were subcutaneously challenged with MCA205 cells and thereafter injected with the MCA205 SLPs and/or 24 mg/kg of IP2 (Fig. 7D). We observed results comparable to those observed in the prophylactic setting. The SLPs MCA205 KB-16 and MCA205 KB-1 but not the SLP MCA205 KB-10 in combination with IP2 were effective in inhibiting the growth of MCA205 tumors (Fig. 7E). Interestingly, while no synergy between the vaccination and the drug treatment was observed at day 22, the overall survival

of mice treated with both MCA205 KB-1 and IP2 was significantly increased (Fig. 7F).

We suggest here that the immunomodulatory agent IP2 can be used to enlarge the pool of targetable tumor-associated (TAAs) and tumor-specific (TSAs) antigens in the context of therapeutic cancer vaccines. Continuous treatment of the tumors is required to ensure the persistence of IP2-induced modifications of the MHC-I immunopeptidome.

## **Material and methods**

### **Cell culture, transfection, plasmids, drugs and peptides**

MCA205 mouse sarcoma cell line is cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium (Life Technologies) in the presence of 1% glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino-acids, 1% penicillin/streptomycin and 10% FBS (Life Technologies) under standard conditions. B16F10 mouse melanoma cell line is cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in DMEM medium (Life Technologies) containing 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 10% FBS. Stable MCA205-Globin-SL8-intron and B16F10-Globin-SL8-intron cell lines are cultured under the same condition as MCA205 and B16F10 cell lines respectively, with additional 2mg/ml G418 (Life Technologies) for selection. The SL8/H-2K<sup>b</sup>-specific B3Z CD8<sup>+</sup> T-cell hybridoma (32) are cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium supplemented with 1% glutamine, 0.1% 2-mercaptoéthanol, 1% penicillin/streptomycin and 10% FBS under standard conditions. Once a month, mycoplasma contamination in cell cultures was assessed using the Venor@GeM OneStep mycoplasma detection kit (Minerva biolabs). All cells were used within four weeks after thawing (≈10 passages). MCA205 cells are transfected with the reagent jetPRIME (Ozyme) according to the manufacturer protocol. B16F10 cells are transfected with the reagent GeneJuice (Millipore) according to the manufacturer protocol. The plasmids YFP-Globin-SL8-intron, YFP-Globin-SL8-exon and PCDNA3-Ova have been described previously (Apcher et al., 2013b). The pre-mRNA splicing inhibitor isoginkgetin (Merck Millipore) is resuspended in DMSO. The IP2 and M2P2 derivatives were synthesized from the isoginkgetin powder and resuspended in PBS. Synthetic long peptides (39AA) were synthesized by GL Biochem, resuspended at 5 mg/mL in PBS at delivery and stored at -20°C.

### **T-cell activation assay**

MCA205 sarcoma and B16F10 melanoma are transfected with the plasmid YFP-Globin-SL8-intron or with the PCDNA3 empty plasmid (negative control) with the transfection reagent jetPRIME (Ozyme) or GeneJuice (Millipore) respectively according to each manufacturer

protocol. Twenty-four hours after transfection, cells are treated with different doses of isoginkgetin (Merk Millipore), IP2 or M2P2 overnight. Cells are then washed three times with PBS 1X and  $5 \times 10^4$  cells are co-cultured with  $1 \times 10^5$  SL8/H-2K<sup>b</sup>-specific B3Z CD8<sup>+</sup> T-cell hybridoma for 18h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> overnight. Cells are centrifuged at 1200rpm for 5min, washed twice with PBS 1X and lysed for 5min at 4°C under shaking. Lysis buffer is composed of 0.2% TritonX-100, 10mM DTT, 90 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The lysate is centrifuged at 3000rpm for 10min to pellet cell debris and the supernatant is transferred to a 96-well optiplate (Packard Bioscience, Randburg, SA). A revelation buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 11,2 mM β-mercaptoéthanol, 0,0015% IGEPAL® CA-630 et 40 μM 4-Methylumbelliferyl β-D-Galactopyranoside (MUG) is added and the plate is incubated at room temperature for 3 hours. Finally, β-galactosidase activity is measured using the FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Germany). Results are expressed as mean ± SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (unpaired student t test).

#### **FACS Analysis: H-2K<sup>b</sup> expression and recovery at the cell surface**

Mouse cells are treated with drugs for 18hours. Human cells are transfected with the plasmid encoding the mouse H-2K<sup>b</sup> molecule for 24 hours, followed by 18hours treatment with drugs. Cells are harvested and  $2 \times 10^6$  human cells are stimulated with 5μg SIINFEKL synthetic peptide for 15min at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Human and murine cell lines are incubated with human or mouse FcR block respectively for 10min at 4°C according to the manufacturer protocol (Miltenyi Biotech). Mouse cells are stained with anti-mouse MHC class I (H-2K<sup>b</sup>)-PerCP-eFluor®710 (AF6-88.5.5.3, eBioscience) or with the corresponding mouse IgG2a K isotype control-PerCP eFluor®710 (eBM2a, eBioscience) for 30min at 4°C. Human cells are stained with anti-mouse OVA257-264 (SIINFEKL) peptide bound to H-2K<sup>b</sup>-APC (25-D1.16, eBioscience) for 30min at 4°C. Cells are stained with DAPI prior to acquisition for dead cell exclusion. In mouse cell lines the isotype antibody is used for PerCP eFluor®710-positive gating while in human cell lines non-stimulated cells are used for APC-positive gating. To study the kinetics of endogenous surface K<sup>b</sup> recovery, cells were treated for 18h with the different drugs. The day after, cells were washed and treated with ice-cold citric acid buffer (0.13M citric acid, 0.061M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15M NaCl [pH 3]) at  $1 \times 10^7$  cells per milliliter for 120s, washed three times with PBS, and resuspended in culture medium. At the indicated time point, an aliquot of cells (generally  $1.5 \times 10^6$ ) was removed and stained with anti-mouse H-2K<sup>b</sup> PE or anti-mouse SIINFEKL-peptide bound to H-2K<sup>b</sup>-PE. All flow cytometry experiments were conducted using the BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and data are analyzed with the FlowJow software (V10). Results are expressed as mean ± SD. \*P<0.05, \*\*P<0.01,

\*\*\*P<0.001 (unpaired student t test).

### **FACS Analysis: Annexin V staining**

Mouse cells are treated with drugs for 18hours. Floating and adherent cells are collected, washed in PBS and resuspended in 1X Annexin V Binding Buffer with APC Annexin V (BD Pharmingen) according to the manufacturer protocol. Cells are gently vortexed and incubated 15 min at RT in the dark. Cells are stained with DAPI prior to flow cytometry analysis. Cells are analyzed using the BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and data are analyzed with the FlowJow software (V10). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (unpaired student t test).

### **MTT assay**

Cells are plated in a 96-well plate with  $1 \times 10^4$  cells per well for 24 hours. Cells are then treated with drug overnight. After removing the medium from the plate, the MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) powder is re-suspended into PBS, filtered and added into the plate wells at 2,5mg/ml. The plate is incubated for 2 hours at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub>. It is then centrifuged and the supernatant is carefully removed in order not to disturb the precipitated formazan. 200 $\mu$ l/well of DMSO is added and the plate is shaken for 10 minutes. Absorbance is read at 544nm using the FLUOstar OPTIMA. Each experiment is repeated three times and the average of the three results is expressed in percentage of cell viability compare to the untreated condition  $\pm$  SEM.

### **RNA preparation, RT and qPCR**

Cells are transfected with the YFP-Globin-SL8-intron plasmid for 24 hours followed by treatment with drugs for 48 hours. Cells are then harvested and total cellular RNA is extracted and purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer protocol. The reverse transcription is carried out with 0.5  $\mu$ g of RNA with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer protocol. The StepOne real-time PCR system (Applied BioSystems) is used for qPCR and the reaction is performed with the Power SYBR green PCR master mix (Applied BioSystems). The results are analyzed using the StepOne software. Mouse gene specific primers are designed as follow: 18S mouse forward primer, 5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG-3'; 18S mouse reverse primer, 5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTCG-3'; Glob-SL8-exon forward primer, 5'-AGAAGTCTGCCGTTACTGCC-3'; Glob-SL8-exon reverse primer, 5'-AGGCCATCACTAAAGGCACC-3'; Glob-SL8-intron forward primer, 5'-GTATCAAGGTTACAAGACAG-3'; Glob-SL8-intron reverse primer, 5'-GGGAAAATAGACCAATAGGC-3'.

### **RNA-Seq : Read mapping, differential mRNA expression and differential splicing**

MCA205 and B16F10 cells were treated with 15  $\mu$ M of isoginkgetin or 35  $\mu$ M of IP2 for 18h. RNA was extracted using QIAGEN RNeasy columns. RNA-seq libraries were prepared from total RNA by poly(A) selection with oligo(dT) beads according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). The resulting RNA samples were then used as input for first-strand stranded library preparation using a custom protocol based on dUTP method as described previously (1). Libraries were sequenced on the Illumina HiSeq 4000 sequencer using 50–base pair paired-end read method.

All RNA-seq data were aligned to the mouse genome assembly mm10 with the TopHat2 splice-junction mapper for RNA-Seq reads (version 2.1.1) with default parameters. For the differential gene expression analysis, the Cuffdiff program (version 2.2.1) was run using the following parameters: `--library-type=fr-firststrand --compatible-hits-norm --library-norm-method geometric --min-reps-for-js-test 2 --dispersion-method per-condition -u -b`. In all such analyses, the difference in expression of a gene was considered significant if the q value was less than 0.05 (the Cuffdiff default) and the fold change was superior to 2. Scatter plots were generated using ggplot2 in R environment. For the differential splicing analysis, the SUPPA2 program was run with the default settings.

### **RNA-Seq: Generation of the *Retained Introns* database**

Libraries were prepared with TruSeq Stranded Total RNASample preparation kit according supplier recommendations. Briefly the key stages of this protocol are successively, the removal of ribosomal RNA fraction from 1 $\mu$ g of total RNA using the Ribo-Zero Gold Kit, a fragmentation using divalent cations under elevated temperature to obtain approximately 300bp pieces, double strand cDNA synthesis, using reverse transcriptase and random primers, and finally Illumina adapters ligation and cDNA library amplification by PCR for sequencing. Sequencing is then carried out on paired-end 75b of Illumina HiSeq4000. The *Retained Introns* database was generated from RNA-seq data (4 replicates for each cell line) according to KMA (KeepMeAround) pipeline which is a suite Python scripts and a R package. Contrary to other existing tools, KMA improves its accuracy by using biological replicates to reduce the number of false positive. The databases were built as follows: (i) Pre-processing step : Intron coordinates were generated by KMA scripts from the genome reference (GENCODE release GRCm38) and the associated annotation file (GTF file); (ii) Quantification step : RNA-seq files were mapped according to previously defined introns and transcript regions with Bowtie2 v2.3.3.1 and were then quantified with eXpress tool v1.5.2 ; (iii) Post-

processing step : Previous generated files were processed by KMA to define a list of retained intron. All expressed introns were considered for the next step. Intron nucleic sequences are then translated in the first three reading frames to create the two databases. Generated amino-acid sequences are then separated according to stop codon and sequences with length lower than 8 amino-acid are discarded. Finally, we identified 135 348 retained introns for MCA205 cells and 140 943 retained introns for B16F10 cells where 124 911 were in common.

### **IP and HLA ligand elution**

400x10<sup>6</sup> MCA205 or B16F10 cells were lysed in 3 mL lysis buffer containing PBS, 0.25% Sodium Deoxycholate and protease inhibitor (Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, EDTA-free, Thermo Fisher) during 1h at 4°C under agitation. Lysate was sonicated and then cleared by centrifugation for 1h at 4,000xg at 4°C. Supernatant was filtered through 0.40µm filter and applied on affinity columns overnight (Econo-Column Chromatography Columns 0.5 X 5 cm, Biorad). Flow was maintained at 10 rpm overnight by a peristaltic pump. IP resins were prepared as follows: (i) 40 mg CNBr-activated Sepharose were activated in 1 mM HCl for 30 min at RT, (ii) 1mg of Y-3 or B22-249 antibodies (kindly provided by Prof. Dr. Stefan Stevanović from University of Tübingen) was added in H<sub>2</sub>O, 0.5M NaCl, 0.1M NaHCO<sub>3</sub> for 2h at RT, (iii) resin was blocked in PBS, 0.2M glycine for 1h at RT and finally (iv) resin was washed twice in PBS and resuspended at 1 mg antibody/mL in PBS. Centrifugation at 300 rpm for 4 min (no brake) and removal of the supernatant were performed between each step. On the second day, the peptides were eluted in 100 µL 0.2% TFA for 25 min at 4°C under agitation. Elution was repeated three times. The four eluates were pooled, cleared by centrifugation for 5 min at 15,000xg and filtered through a 3 kDa filter (Pall Nanosep® centrifugal device with Omega membrane). Omega Membrane was rinsed with 32.5% ACN, 0.2% TFA and the sample was concentrated using a Speed Vac Concentrator (Thermo Scientific). Samples were stored at -80°C prior LC-MS/MS analysis.

### **LC-MS/MS acquisition and qualitative analysis**

The peptides were desalted using ZipTip C<sup>18</sup> pipette tips (Pierce Thermo Scientific), eluted in 40 µL acetonitrile 70% (Fisher Scientific)/0.1% formic acid, vacuum centrifuged and resuspended in 12 µL of 0.1% formic acid. All C18 zip-tipped peptides extracts were analyzed using an Orbitrap Fusion Tribrid equipped with an EASY-Spray Nano electrospray ion source and coupled to an Easy Nano-LC Proxeon 1200 system (all devices are from Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Chromatographic separation of peptides was performed with the following parameters: Acclaim PepMap100 C18 pre-column (2 cm, 75 µm i.d., 3 µm, 100 Å), Pepmap-RSLC Proxeon C18 column (75 cm, 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å),

300nl/min flow, gradient rising from 95 % solvent A (water, 0.1% formic acid) to 28% solvent B (80% acetonitrile, 0.1% formic acid) in 105 minutes and then up to 40%B in 15min followed by column regeneration for 50 min. Peptides were analyzed in the orbitrap in full ion scan mode at a resolution of 120000 and with a mass range of  $m/z$  400-650 using quadrupole isolation and an AGC target of  $1.5 \times 10^5$ . Fragments were obtained by Collision Induced Dissociation (CID) activation with a collisional energy of 35 %. MS/MS data were acquired in the Orbitrap in a top-speed mode, with a total cycle of 3 seconds with an AGC target of  $7 \times 10^4$ . The maximum ion accumulation times were set to 100 ms for MS acquisition and 150 ms for MS/MS acquisition in parallelization mode. All MS/MS data were processed with an in-house Sequest server node using Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific) for qualitative analysis. The mass tolerance was set to 10 ppm for precursor ions and 0.02 Da for fragments. The following modification was used as variable modification: oxidation. No enzyme search was applied. All peptides were filtered at 5% FDR. MS/MS data were searched against an in house *Retained Intron* database (MCA205 or B16F10) and Mouse Uniprot extracted database.

#### **Quantitative analysis in label-free experiments**

Label-free quantification in between subject analysis was performed on raw data with Progenesis-Qi software 4.1 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K.) using the following procedure: (i) chromatograms alignment, (ii) peptide abundances normalization, (iii) statistical analyses of features, and (iv) peptides identification using Sequest server through Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific). The mass tolerance was set to 10 ppm for precursor ions and 0.02 Da for fragments. The following modification was used as variable modification: oxidation. No enzyme search was applied. A decoy search was performed and the significance threshold was fixed to 0.05. MS/MS data were searched against an in house *Retained Intron* database (MCA205 or B16F10) and Mouse Uniprot extracted database. The resulting files were imported into Progenesis-LC software.

#### **Data availability**

The complete proteomics data sets are available in the PRIDE partner repository under the identification number: PXD012102 as .raw files, Proteome Discoverer 2.2 .pdResult file, associated pep.xml and xlsx files, label-free peptides and proteins report generated by Progenesis QI.

#### ***Ex vivo* assessment of peptide immunogenicity**

C57BL/6 mice were vaccinated subcutaneously at the tail base with 100  $\mu$ g of synthetic long peptide mixed with 30  $\mu$ G ODN 1668. One week after, CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from

spleens of vaccinated mice using magnetic selection with CD8a (Ly-2) MicroBeads (Miltenyi Biotec). CD8<sup>+</sup> T cells are co-cultured with BMDCs pulsed with 30 mg/mL of synthetic long peptides for 18h in ELISpot plates coated with anti-IFN $\gamma$  capture antibody (Cell Sciences). Spots are revealed according to manufacturer instructions. IL-2 concentration is measured in the supernatants of the co-culture between CD8<sup>+</sup> T cells and peptide-pulsed BMDCs using the Mouse IL-2 ELISA MAX Standard kit (BioLegend).

#### ***In vivo* experimentation: tumor challenge and drug treatment**

Female wild-type C57BL/6 mice at the age of 6 weeks were obtained from Harlan France. NU/NU nude mice are obtained from Charles River France. Animal experiments were conducted in compliance with the EU Directive 63/2010, and protocols 2016\_064\_5677 and were approved by the Ethical Committee of the Gustave Roussy Campus Cancer (CEEA IRCIV/IGR no. 26, registered at the French Ministry of Research). Mice are challenged subcutaneously in the right flank with 5x10<sup>4</sup> MCA205 wild type (WT) or 7.5x10<sup>4</sup> MCA205 globin-SL8-intron cells, or with 5x10<sup>4</sup> B16F10 wild type (WT) or B16F10-Globin-SL8-intron cells along with matrigel (VWR). Five days after challenge, mice are treated intraperitoneally with different dose of isoginkgetin, IP2 or M2P2. Intraperitoneal injection is repeated at day 10 and 15. Area of the tumor is recorded every 3 to 4 days until ethical limit points are reached. Mice which experience complete tumor regression are kept for 100 days after tumor challenge and are then re-challenged subcutaneously on the right flank with 7.5x10<sup>4</sup> MCA205-Globin-SL8-intron cells and on the left flank with 5x10<sup>4</sup> B16F10 WT cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (ANOVA with Dunnett's multiple comparison test comparing all groups to control).

#### ***In vivo* proliferation of adoptively transferred OT-I CD8<sup>+</sup> T cells**

C57BL/6 mice were challenged subcutaneously with 3.0x10<sup>5</sup> MCA205 globin-SL8-intron cells and thereafter treated with 24 mg/kg of IP2 at days 8 and 11. At day 12, OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from spleens of OT-1 mice using magnetic selection with CD8a (Ly-2) MicroBeads (Miltenyi Biotec) and then intravenously injected into tumor-bearing mice at 3.0x10<sup>6</sup> cells/mouse. Three days after transfer, proliferation of OT-1 cells was measured in spleens by flow cytometry after staining with anti-CD8-FITC and APC-conjugated SL8/H-2K<sup>b</sup> Dextramers (Immudex).

#### ***In vivo* experimentation: prophylactic and therapeutic vaccination**

In the prophylactic setting, C57BL/6 mice were vaccinated twice subcutaneously at the tail base with 100  $\mu$ g of synthetic long peptide mixed with 30  $\mu$ G ODN 1668, two weeks apart (prime-boost). One week after the booster injection, 1.5x10<sup>5</sup> MCA205 WT or 5.0x10<sup>4</sup>

B16F10 WT were inoculated subcutaneously in the right flank. Mice were then treated twice a week with 24 mg/kg (MCA205 WT) or 36 mg/kg (B16F10 WT) of IP2 for two weeks. In the therapeutic setting, C57BL/6 mice were injected subcutaneously in the right flank with  $1.5 \times 10^5$  MCA205 WT or  $5.0 \times 10^4$  B16F10 WT and thereafter vaccinated once a week with 100  $\mu$ g of synthetic long peptide mixed with 30  $\mu$ g ODN 1668 and treated twice a week with 24 mg/kg (MCA205 WT) or 36 mg/kg (B16F10 WT) of IP2 for two weeks. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (ANOVA with Tukey's multiple comparison test comparing all groups).

### **Acknowledgments:**

The MCA-205 cell line was a gift from Prof. Laurence Zitvogel, Gustave Roussy Institute. We also thank Prof. Laurence Zitvogel for valuable comments on the manuscript. The IP antibodies were kindly provided by Prof. Dr. Stefan Stevanović from University of Tübingen. This work was funded by the FRM, project code n° DCM20181039530, The Avenir program (INSERM), La Fondation ARC, and Fondation Gustave Roussy. AP and RD were supported by the Université Paris Saclay, RD was also supported by the Fondation Philantropia, MB is supported by the Fondation Gustave Roussy.

### **References**

1. Caron E, Vincent K, Fortier MH, Laverdure JP, Bramouille A, Hardy MP, *et al.* The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol Syst Biol* **2011**;7:533
2. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **2011**;480:480-9
3. van der Burg SH, Arens R, Ossendorp F, van Hall T, Melief CJ. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat Rev Cancer* **2016**;16:219-33
4. Liu Y, Komohara Y, Domenick N, Ohno M, Ikeura M, Hamilton RL, *et al.* Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2012**;61:789-801
5. Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, *et al.* Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* **2006**;118:6-10
6. Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* **2013**;105:1172-87

7. Kmiecniak M, Knutson KL, Dumur CI, Manjili MH. HER-2/neu antigen loss and relapse of mammary carcinoma are actively induced by T cell-mediated anti-tumor immune responses. *European journal of immunology* **2007**;37:675-85
8. Lee SY, Sin JI. MC32 tumor cells acquire Ag-specific CTL resistance through the loss of CEA in a colon cancer model. *Hum Vaccin Immunother* **2015**;11:2012-20
9. Bassani-Sternberg M, Braunlein E, Klar R, Engleitner T, Sinitcyn P, Audehm S, *et al.* Direct identification of clinically relevant neopeptides presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun* **2016**;7:13404
10. Liu WM, Fowler DW, Smith P, Dalgleish AG. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br J Cancer* **2010**;102:115-23
11. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* **2010**;102:493-501
12. Verdegaal EM, de Miranda NF, Visser M, Harryvan T, van Buuren MM, Andersen RS, *et al.* Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature* **2016**;536:91-5
13. Anton LC, Yewdell JW. Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. *J Leukoc Biol* **2014**;95:551-62
14. Dolan BP, Li L, Veltri CA, Ireland CM, Bennink JR, Yewdell JW. Distinct pathways generate peptides from defective ribosomal products for CD8+ T cell immunosurveillance. *J Immunol* **2011**;186:2065-72
15. Wei J, Yewdell JW. Autoimmune T cell recognition of alternative-reading-frame-encoded peptides. *Nat Med* **2017**;23:409-10
16. Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* **1996**;157:1823-6
17. Apcher S, Daskalogianni C, Lejeune F, Manoury B, Imhoos G, Heslop L, *et al.* Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**;108:11572-7
18. Apcher S, Millot G, Daskalogianni C, Scherl A, Manoury B, Fahraeus R. Translation of pre-spliced RNAs in the nuclear compartment generates peptides for the MHC class I pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**;110:17951-6
19. Duvallat E, Boulpicante M, Yamazaki T, Daskalogianni C, Prado Martins R, Baconnais S, *et al.* Exosome-driven transfer of tumor-associated Pioneer Translation Products (TA-PTPs) for the MHC class I cross-presentation pathway. *Oncoimmunology* **2016**;5:e1198865
20. Eggermont AM, Maio M, Robert C. Immune checkpoint inhibitors in melanoma provide the cornerstones for curative therapies. *Semin Oncol* **2015**;42:429-35
21. Memon H, Patel BM. Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: A bird's eye view. *Life Sci* **2019**;233:116713
22. Shortt J, Hsu AK, Johnstone RW. Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. *Oncogene* **2013**;32:4191-202
23. Yoon SO, Shin S, Lee HJ, Chun HK, Chung AS. Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol Cancer Ther* **2006**;5:2666-75

24. Tsalikis J, Abdel-Nour M, Farahvash A, Sorbara MT, Poon S, Philpott DJ, *et al.* Isoginkgetin, a Natural Biflavonoid Proteasome Inhibitor, Sensitizes Cancer Cells to Apoptosis via Disruption of Lysosomal Homeostasis and Impaired Protein Clearance. *Mol Cell Biol* **2019**;39
25. O'Brien K, Matlin AJ, Lowell AM, Moore MJ. The biflavonoid isoginkgetin is a general inhibitor of Pre-mRNA splicing. *The Journal of biological chemistry* **2008**;283:33147-54
26. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**;15:108-21
27. Kaida D, Schneider-Poetsch T, Yoshida M. Splicing in oncogenesis and tumor suppression. *Cancer Sci* **2012**;103:1611-6
28. Miura K, Fujibuchi W, Unno M. Splice variants in apoptotic pathway. *Exp Oncol* **2012**;34:212-7
29. Song X, Zeng Z, Wei H, Wang Z. Alternative splicing in cancers: From aberrant regulation to new therapeutics. *Semin Cell Dev Biol* **2018**;75:13-22
30. Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe RA, Skotheim RI. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* **2016**;35:2413-27
31. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **2011**;331:1565-70
32. Shastri N, Gonzalez F. Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/Kb complex to T cells. *J Immunol* **1993**;150:2724-36
33. Spiotto MT, Rowley DA, Schreiber H. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat Med* **2004**;10:294-8
34. Smart AC, Margolis CA, Pimentel H, He MX, Miao D, Adeegbe D, *et al.* Intron retention is a source of neoepitopes in cancer. *Nat Biotechnol* **2018**;36:1056-8
35. Laumont CM, Daouda T, Laverdure JP, Bonneil E, Caron-Lizotte O, Hardy MP, *et al.* Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nat Commun* **2016**;7:10238
36. Shen S, Wang Y, Wang C, Wu YN, Xing Y. SURVIV for survival analysis of mRNA isoform variation. *Nat Commun* **2016**;7:11548
37. Tsai YS, Dominguez D, Gomez SM, Wang Z. Transcriptome-wide identification and study of cancer-specific splicing events across multiple tumors. *Oncotarget* **2015**;6:6825-39
38. Lee SC, Dvinge H, Kim E, Cho H, Micol JB, Chung YR, *et al.* Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nat Med* **2016**;22:672-8
39. Buferne M, Chasson L, Grange M, Mas A, Arnoux F, Bertuzzi M, *et al.* IFN $\gamma$  producing CD8(+) T cells modified to resist major immune checkpoints induce regression of MHC class I-deficient melanomas. *Oncoimmunology* **2015**;4:e974959
40. Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H. IFN- $\gamma$ - and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *The Journal of clinical investigation* **2008**;118:1398-404
41. van Hall T, Wolpert EZ, van Veelen P, Laban S, van der Veer M, Roseboom M, *et al.* Selective cytotoxic T-lymphocyte targeting of tumor immune escape variants. *Nat Med* **2006**;12:417-24
42. Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, Nojima T, Hagiwara M, Ishigami K, *et al.* Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol* **2007**;3:576-83

43. Kotake Y, Sagane K, Owa T, Mimori-Kiyosue Y, Shimizu H, Uesugi M, *et al.* Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol* **2007**;3:570-5
44. Wei J, Kishton RJ, Angel M, Conn CS, Dalla-Venezia N, Marcel V, *et al.* Ribosomal Proteins Regulate MHC Class I Peptide Generation for Immunosurveillance. *Mol Cell* **2019**;73:1162-73 e5
45. de Verteuil D, Granados DP, Thibault P, Perreault C. Origin and plasticity of MHC I-associated self peptides. *Autoimmun Rev* **2012**;11:627-35
46. 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. *Nat Commun* **2014**;5:3600
47. Granados DP, Yahyaoui W, Laumont CM, Daouda T, Muratore-Schroeder TL, Cote C, *et al.* MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements. *Blood* **2012**;119:e181-91
48. 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. *The Journal of clinical investigation* **2016**;126:4690-701
49. Khurana E, Fu Y, Chakravarty D, Demichelis F, Rubin MA, Gerstein M. Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nat Rev Genet* **2016**;17:93-108
50. Gravett AM, Trautwein N, Stevanovic S, Dalgleish AG, Copier J. Gemcitabine alters the proteasome composition and immunopeptidome of tumour cells. *Oncoimmunology* **2018**;7:e1438107
51. Javitt A, Barnea E, Kramer MP, Wolf-Levy H, Levin Y, Admon A, *et al.* Pro-inflammatory Cytokines Alter the Immunopeptidome Landscape by Modulation of HLA-B Expression. *Frontiers in immunology* **2019**;10:141
52. Gerashchenko MV, Lobanov AV, Gladyshev VN. Genome-wide ribosome profiling reveals complex translational regulation in response to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**;109:17394-9
53. Starck SR, Tsai JC, Chen K, Shodiya M, Wang L, Yahiro K, *et al.* Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science* **2016**;351:aad3867
54. Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W, Huber C, Parmiani G, Scholl S, *et al.* Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* **2014**;11:509-24
55. Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**;4
56. Steers NJ, Currier JR, Jobe O, Tovanabutra S, Ratto-Kim S, Marovich MA, *et al.* Designing the epitope flanking regions for optimal generation of CTL epitopes. *Vaccine* **2014**;32:3509-16
57. Fennemann FL, de Vries IJM, Figdor CG, Verdoes M. Attacking Tumors From All Sides: Personalized Multiplex Vaccines to Tackle Intratumor Heterogeneity. *Frontiers in immunology* **2019**;10:824
58. Manasanch EE, Orłowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**;14:417-33

**Figure 1: The splicing inhibitor isoginkgetin increases exon- and intron-derived SL8 presentation in cancer cells *in vitro* and inhibits the growth of SL8 expressing tumor in an immune-dependent manner *in vivo*.**

SL8-specific B3Z T cell activation after co-culture with mouse sarcoma MCA205 and mouse melanoma B16F10 cell lines both transiently expressing (A) the intron-derived SL8 epitope, (B) the exon-derived SL8 epitope or (C) the OVA cDNA construct and treated for 18h with isoginkgetin at indicated doses. Unspecific B3Z T-cell activation was considered to normalize the results. Data are means  $\pm$  SEM of relative B3Z T-cell activation for three technical replicates. Each graph is representative of at least four independent experiments. Tumor growth kinetics of (D) MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) both stably expressing the globin-SL8-intron construct and (E) MCA205 sarcoma WT (left panel) and B16F10 melanoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice thereafter treated intraperitoneally with 18mg/kg of isoginkgetin at days 5, 10 and 15. Tumor growth kinetics of (F) MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) both stably expressing the globin-SL8-intron construct and (G) MCA205 sarcoma WT (left panel) and B16F10 melanoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunodeficient nude mice thereafter treated intraperitoneally with 18mg/kg of isoginkgetin at days 5, 10 and 15. Data are means  $\pm$  SEM of tumor sizes for 6 to 8 mice per group. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (Student t test and one way-ANOVA)

**Figure 2: The derivative IP2 retains the properties of the parent isoginkgetin on antigen presentation with reduced cytotoxicity.**

(A) SL8-specific B3Z T cell activation after co-culture with mouse sarcoma MCA205 and mouse melanoma B16F10 cell lines both transiently expressing the intron-derived SL8 epitope and treated for 18h with IP2 (left panel) or M2P2 (right panel) at indicated doses. Unspecific B3Z T-cell activation was considered to normalize the results. Data are means  $\pm$  SEM of relative B3Z T-cell activation for three technical replicates. Each graph is representative of at least four independent experiments. (B) Analysis by flow cytometry of H-2K<sup>b</sup> expression at the surface of MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) treated with IP2 or M2P2 for 18h at indicated doses. Data are means  $\pm$  SEM of H-2K<sup>b</sup> frequency for three biological replicates. (C) Analysis by flow cytometry of the apoptotic status of MCA205 and B16F10 cells treated with 35 $\mu$ M or 1000  $\mu$ M of IP2 for 18 hours and stained with DAPI and Annexin V-APC. Data highlight the proportion of late apoptotic cells (top right quadrant) and are representative of three independent experiments. (D) Comparison

of gene expression profile between isoginkgetin-treated (left panels) and IP2-treated (right panels) MCA205 sarcoma (top panels) and B16F10 melanoma (bottom panels).

**Figure 3: IP2 treatment reduces tumor growth and extends survival.**

Tumor growth kinetics of (A) MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) both stably expressing the globin-SL8-intron construct and (B) MCA205 sarcoma WT (left panel) and B16F10 melanoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice thereafter treated at days 5, 10 and 15 with isoginkgetin, M2P2 or IP2 at indicated doses. Data are means  $\pm$  SEM of tumor sizes for 6 to 8 mice per group. (C) Kaplan-Meier survival curves of mice subcutaneously challenged with MCA205 sarcoma cells stably expressing the globin-SL8-intron construct and thereafter treated intraperitoneally with 18mg/kg of isoginkgetin, 18mg/kg of M2P2 or 18mg/kg of IP2. A Log-rank (Mantel-Cox) test was performed. (D) Tumor growth kinetics of MCA205 cells stably expressing the Globin-SL8-intron construct and B16F10 WT cells inoculated at day 100 in the ipsilateral side and the contralateral side, respectively, of C57BL/6 mice which experienced total tumor regression after first inoculation of MCA205 globin-SL8-intron at day 0 and subsequent treatment with isoginkgetin (left panel) or IP2 (right panel) at days 5, 10 and 15. Data are means  $\pm$  SEM of tumor sizes for at least 4 mice per group. (E) Tumor growth kinetics of MCA205 sarcoma stably expressing the globin-SL8-intron construct (left panel) and MCA205 sarcoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice thereafter treated once established (30 mm<sup>2</sup>) at days 5, 10 and 15 with 30 mg/kg of IP2. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (One way-ANOVA)

**Figure 4: IP2 therapeutic effect is dependent on the immune response.**

Tumor growth kinetics of (A) MCA205 sarcoma stably expressing the globin-SL8-intron construct (left panel) and MCA205 sarcoma WT (right panel) and (B) B16F10 melanoma stably expressing the globin-SL8-intron construct (left panel) and B16F10 melanoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunodeficient nude mice thereafter treated at days 5, 10 and 15 with 18 mg/kg of IP2. Data are means  $\pm$  SEM of tumor sizes for 6 to 8 mice per group. (C) Tumor size at killing of MCA205 sarcoma stably expressing the globin-SL8-intron construct (left panel) and MCA205 sarcoma WT (left panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice thereafter treated with 24mg/kg of IP2 at days 5, 10 and 15 and CD8<sup>+</sup> T cell depleting antibody every three days. Data are given as mean  $\pm$  SEM of tumor size for 6 mice per group. (D) Analysis by flow cytometry of SL8-specific OT-1 CD8<sup>+</sup> T cell proliferation after intravenous adoptive transfer of OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells into immunocompetent C57BL/6 mice bearing MCA205

globin-SL8-intron sarcoma and treated with 24 mg/kg of IP2. Data highlight the frequency of SL8-specific OT-1 CD8<sup>+</sup> T cells (top right quadrant) in the spleens and are representative of 5 mice per group. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (One way-ANOVA).

**Figure 5: IP2 modifies the presentation of both conventional and non-conventional MIPs.**

Length of the peptides found exclusively at the surface of IP2-treated or untreated (A) MCA205 sarcoma cells and (B) B16F10 melanoma cells in the context of H-2K<sup>b</sup> (left panels) or H-2D<sup>b</sup> (right panels) molecules. Data are given as mean ± SEM for three independent elutions per condition. Volcano plots displaying the differential presentation of (C) H-2K<sup>b</sup>-restricted peptides in MCA205 cells, (D) H-2D<sup>b</sup>-restricted peptides in MCA205 cells, (E) H-2K<sup>b</sup>-restricted peptides in B16F10 cells and (F) H-2D<sup>b</sup>-restricted peptides in B16F10 cells between IP2-treated and untreated cells. Identification was performed on the “Retained Introns + Uniprot” database. Red dots represent the peptides displaying at least a two-fold increase with a p-value less than 0.05 between the untreated vs IP2-treated triplicates. Blue dots represent the peptides displaying at least a two-fold decrease with a p-value less than 0.05 between the untreated vs IP2-treated triplicates. Accession numbers refer to peptide ID in the corresponding database. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (Student *t* test).

**Figure 6: Vaccination with IP2-induced peptides generates reactive CD8<sup>+</sup> T cells.**

(A) Frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells secreting IFN<sub>γ</sub> in response to MCA205 peptide pools (left panel) and B16F10 peptide pools (right panel), as measured by ELISpot. (B) Frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells secreting IFN<sub>γ</sub> in response to MCA205 individual peptides (left panel) and B16F10 individual peptides (right panel), as measured by ELISpot. (C) Concentrations of IL-2 secreted by CD8<sup>+</sup> T cells in response to MCA205 individual peptides (left panel) and B16F10 individual peptides (right panel), as measured by ELISA. Data are given as mean ± SEM for at least two independent vaccinations. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (One-way ANOVA).

**Figure 7: Combinations of IP2 with prophylactic or therapeutic peptide vaccines inhibit tumor growth.**

(A) Experimental setting for the evaluation of the antitumor activity of IP2 in combination with prophylactic peptide vaccine. (B) Tumor growth kinetics (left panel) and tumor size at killing (right panel) of MCA205 WT sarcoma subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice previously vaccinated in a prophylactic setting with SLP encompassing IP2-induced epitopes and treated with 24 mg/kg of IP2 from tumor cell inoculation. (C) Tumor growth kinetics (left panel) and tumor size at killing (right panel) of

B16F10 WT melanoma subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice previously vaccinated in a prophylactic setting with SLP encompassing IP2-induced epitopes and treated with 36 mg/kg of IP2 from tumor cell inoculation. **(D)** Experimental setting for the evaluation of the antitumor activity of IP2 in combination with therapeutic peptide vaccine. **(E)** Tumor growth kinetics (left panel) and tumor size at killing (right panel) of MCA205 WT sarcoma subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice thereafter vaccinated once a week with SLP encompassing IP2-induced epitopes (therapeutic setting) and treated twice a week with 24 mg/kg of IP2. Data are means  $\pm$  SEM of tumor sizes for 6 to 10 mice per group. **(F)** Kaplan-Meier survival curves of mice subcutaneously challenged with MCA205 WT sarcoma and thereafter treated with the combination of 24 mg/kg of IP2 and SLP encompassing IP2-induced epitopes in a therapeutic setting. A Log-rank (Mantel-Cox) test was performed. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (One way-ANOVA).

**Figure S1: Supplementary data for Figure 1.**

**(A)** Cytotoxicity of isoginkgetin for MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) assessed by MTT assay. Data are given as means  $\pm$  SEM of relative cell viability after treatment for three technical replicates. Each graph is representative of three independent experiments. Red dashed line indicates the dose that induces 50% of cell death. **(B)** Analysis by flow cytometry of H-2K<sup>b</sup> expression at the surface of MCA205 (left panel) and B16F10 (right panel) cells treated with 15  $\mu$ M or 25  $\mu$ M of isoginkgetin for 18h. Data are means  $\pm$  SEM of H-2K<sup>b</sup> frequency for three biological replicates. Tumor size at killing of **(C)** MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) both stably expressing the globin-SL8-intron construct and **(D)** MCA205 sarcoma WT (left panel) and B16F10 melanoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice thereafter treated intraperitoneally with 18mg/kg of isoginkgetin at days 5, 10 and 15. Tumor size at killing of **(E)** MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) both stably expressing the globin-SL8-intron construct and **(F)** MCA205 sarcoma WT (left panel) and B16F10 melanoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunodeficient nude mice thereafter treated intraperitoneally with 18mg/kg of isoginkgetin at days 5, 10 and 15. Data are means  $\pm$  SEM of tumor sizes for 6 to 8 mice per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Student *t* test and one way-ANOVA).

**Figure S2: Synthesis process of isoginkgetine derivatives IP2 and M2P2.**

Red rectangles highlight the structure of IP2 (2) and M2P2 (4) compounds.

**Figure S3: Supplementary data for Figure 2.**

(A) SL8-specific B3Z T cell activation after co-culture with mouse sarcoma MCA205 and mouse melanoma B16F10 cell lines both transiently expressing the intron-derived SL8 epitope and treated for 18h with cyclophosphamide (left panel) and gemcitabine (right panel) at indicated doses. Unspecific B3Z T-cell activation was considered to normalize the results. Data are means  $\pm$  SEM of relative B3Z T-cell activation for three technical replicates. Each graph is representative of at three independent experiments. (B) Kinetics of the recovery of H-2K<sup>b</sup> molecules at the surface of MCA205 cells after acid strip followed by flow cytometry with PE-anti-H-2K<sup>b</sup> antibody. Cells are treated with 25  $\mu$ M of isoginkgetin, 35  $\mu$ M of M2P2 or 35  $\mu$ M of IP2 for 18h prior to acid strip. MFI, Mean Fluorescent Unit. This graph is representative of three independent experiments. (C) Cytotoxicity of IP2 for MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) assessed by MTT assay. Data are given as means  $\pm$  SEM of relative cell viability after treatment for three technical replicates. Each graph is representative of three independent experiments. Red dashed line indicates the dose that induces 50% of cell death. (D) Analysis of splicing inhibition assessed by quantitative RT-PCR in MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) cell lines both transiently expressing the globin-SL8-intron construct and treated with 15 $\mu$ M of isoginkgetin, 35 $\mu$ M of IP2 or 35 $\mu$ M of M2P2 for 48 hours. Data are given as mean  $\pm$  SEM of the ratio of 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> intron to 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> exon of at least three independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (unpaired student t test). (E) Venn diagram showing the number of alternative splicing events induced by isoginkgetin and IP2 in MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel). Differential splicing was determined from RNA-seq using the SUPPA2 algorithm.

**Figure S4: Supplementary data for Figure 3.**

Tumor size at killing of (A) MCA205 sarcoma (left panel) and B16F10 melanoma (right panel) both stably expressing the globin-SL8-intron construct and (B) MCA205 sarcoma WT (left panel) and B16F10 melanoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 mice thereafter treated at days 5, 10 and 15 with isoginkgetin, M2P2 or IP2 at indicated doses. (C) Tumor size at killing of MCA205 sarcoma stably expressing the globin-SL8-intron construct (left panel) and MCA205 sarcoma WT (right panel) subcutaneously inoculated into the right flank of immunocompetent C57BL/6 thereafter treated once established (30 mm<sup>2</sup>) at days 5, 10 and 15 with 30 mg/kg of IP2. Data are means  $\pm$  SEM of tumor sizes for 6 to 8 mice per group. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (One-way ANOVA).

**Table 1: IP2 treatment leads to the presentation of new peptides derived from both**

### **coding and allegedly non-coding sequences**

List of peptides found exclusively after IP2 treatment in MCA205 cells (upper table) or B16F10 cells (lower table) with a p-value less than 0.05 between the untreated vs IP2-treated triplicates. Peptide identification was performed on the “Retained Intron + Uniprot database” or the “All frame” database. Amino acids highlighted in bold correspond to mutations. Ret.Intron = retained intron, PFR = promoter flanking region.

### **Supplementary Table 1**

List of peptides displaying at least a two-fold variation with a p-value less than 0.05 between the untreated vs IP2-treated triplicates in MCA205 cells. Accession numbers refer either to the reference proteome of *Mus musculus* or to our in house MCA205 “Retained Introns” database (cf Material and methods). “Novel” indicates that the present study is the first time the peptide has been reported. “IEDB” indicates that the peptide is found in the immune epitope database. “IEDB\*” indicates that the peptide is found in the immune epitope database with a different length.

### **Supplementary Table 2**

List of peptides displaying at least a two-fold variation with a p-value less than 0.05 between the untreated vs IP2-treated triplicates in B16F10 cells. Accession numbers refer either to the reference proteome of *Mus musculus* or to our in house B16F10 “Retained Introns” database (cf Material and methods). “Novel” indicates that the present study is the first time the peptide has been reported. “IEDB” indicates that the peptide is found in the immune epitope database. “IEDB\*” indicates that the peptide is found in the immune epitope database with a different length.

### **Supplementary Table 3**

List of peptides displaying at least a two-fold variation with a p-value less than 0.05 between the untreated vs IP2-treated triplicates in MCA205 cells. Accession numbers refer to our in house MCA205 “All frame” database (cf Material and methods). “Novel” indicates that the present study is the first time the peptide has been reported. “IEDB” indicates that the peptide is found in the immune epitope database. “IEDB\*” indicates that the peptide is found in the immune epitope database with a different length.

### **Supplementary Table 4**

List of peptides displaying at least a two-fold variation with a p-value less than 0.05 between the untreated vs IP2-treated triplicates in B16F10 cells. Accession numbers refer to our in house B16F10 “All frame” database (cf Material and methods). “Novel” indicates that the present study is the first time the peptide has been reported. “IEDB” indicates that the peptide

is found in the immune epitope database. “IEDB\*” indicates that the peptide is found in the immune epitope database with a different length.

**Supplementary Table 5**

Composition of the immunization pools. Epitope sequence is highlighted in red.

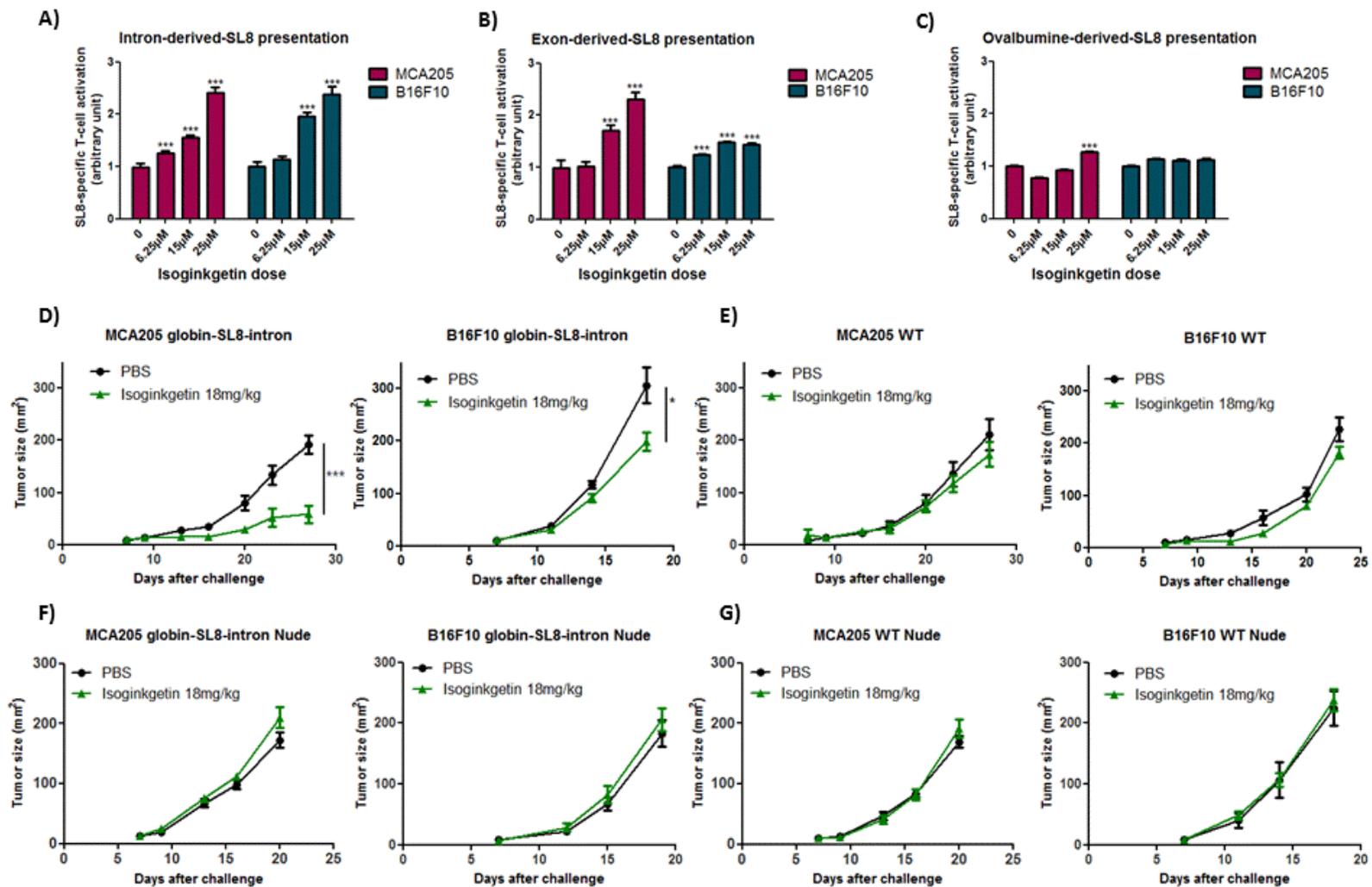


Figure 1

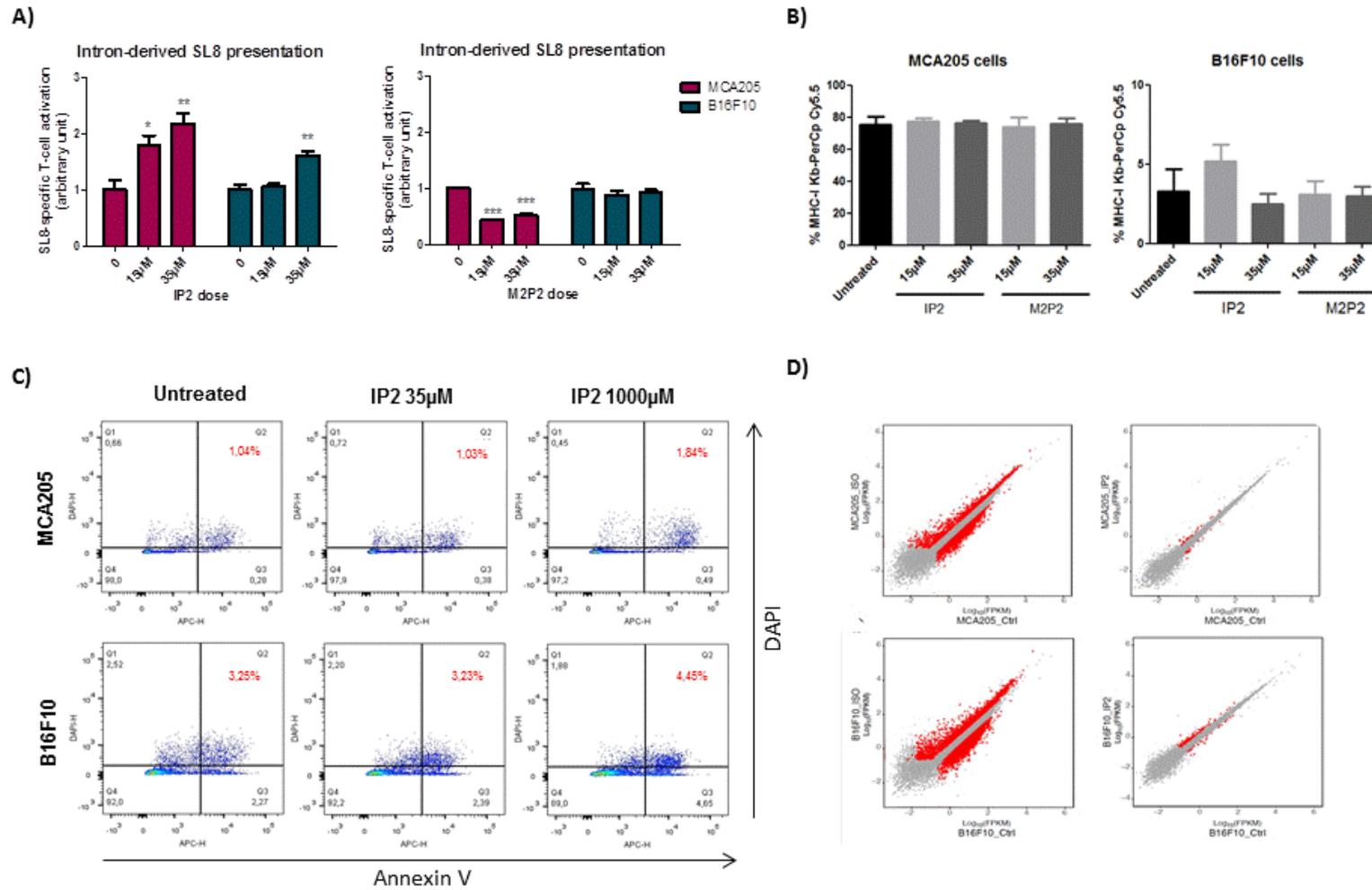
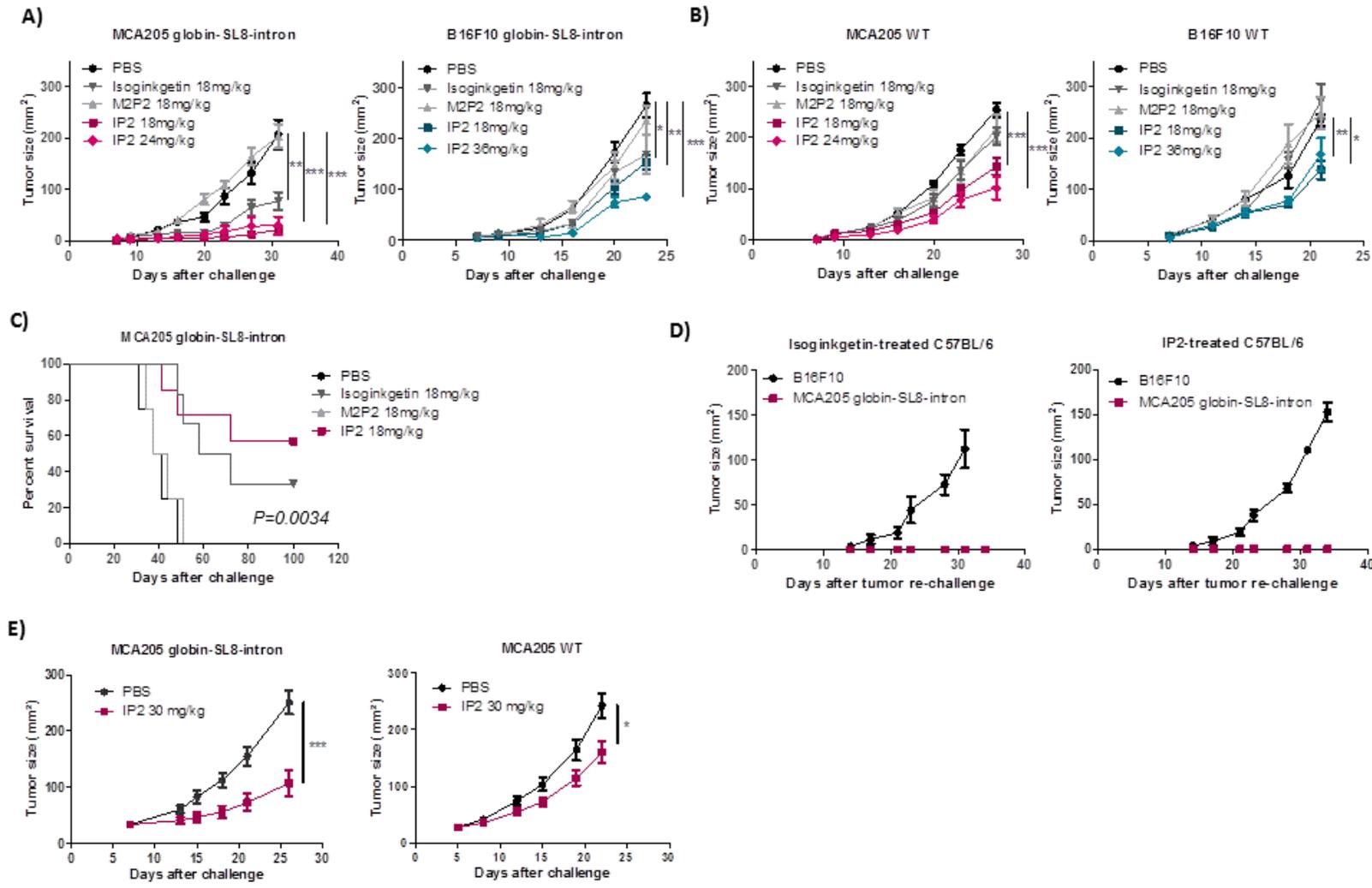
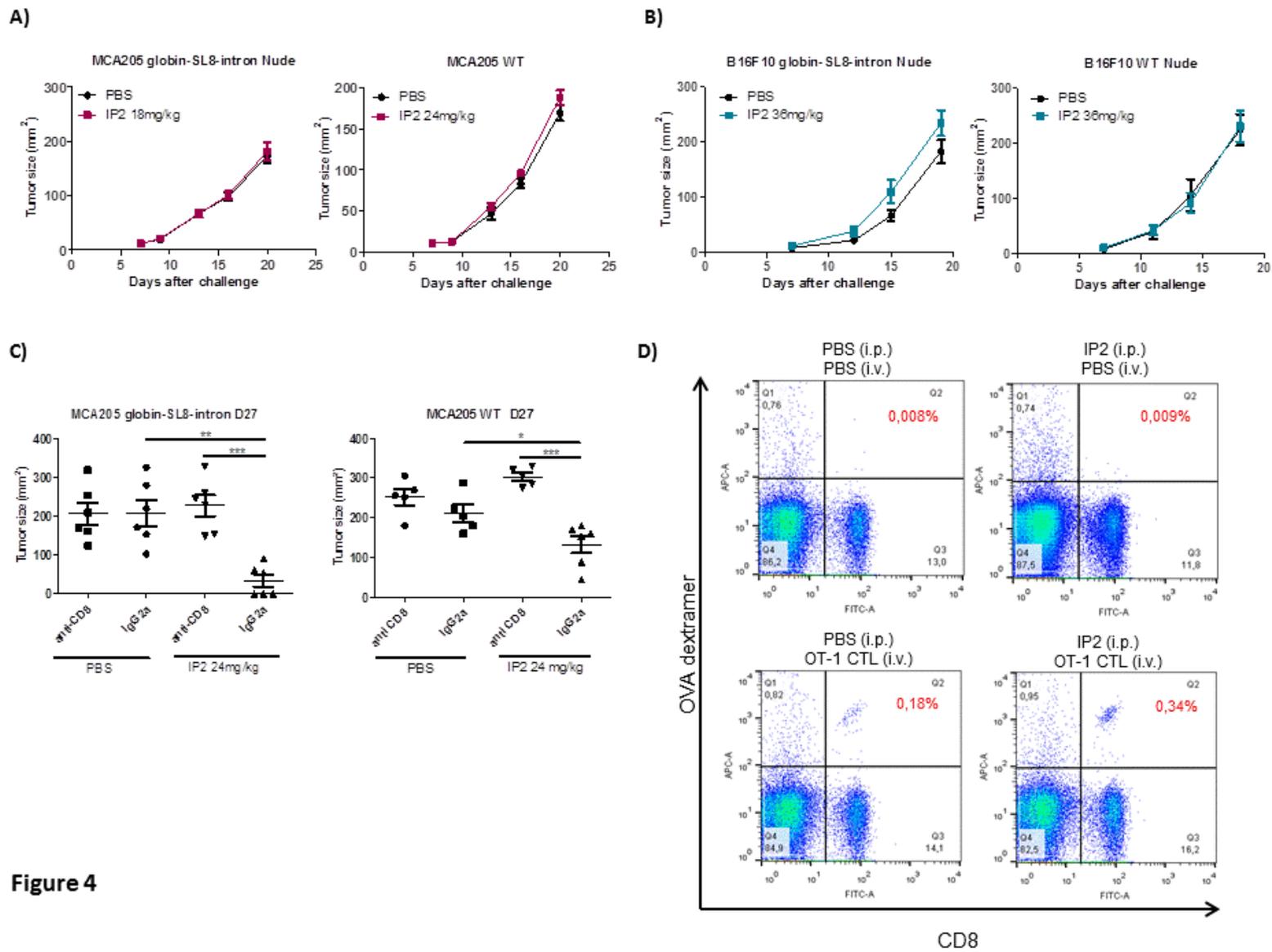


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

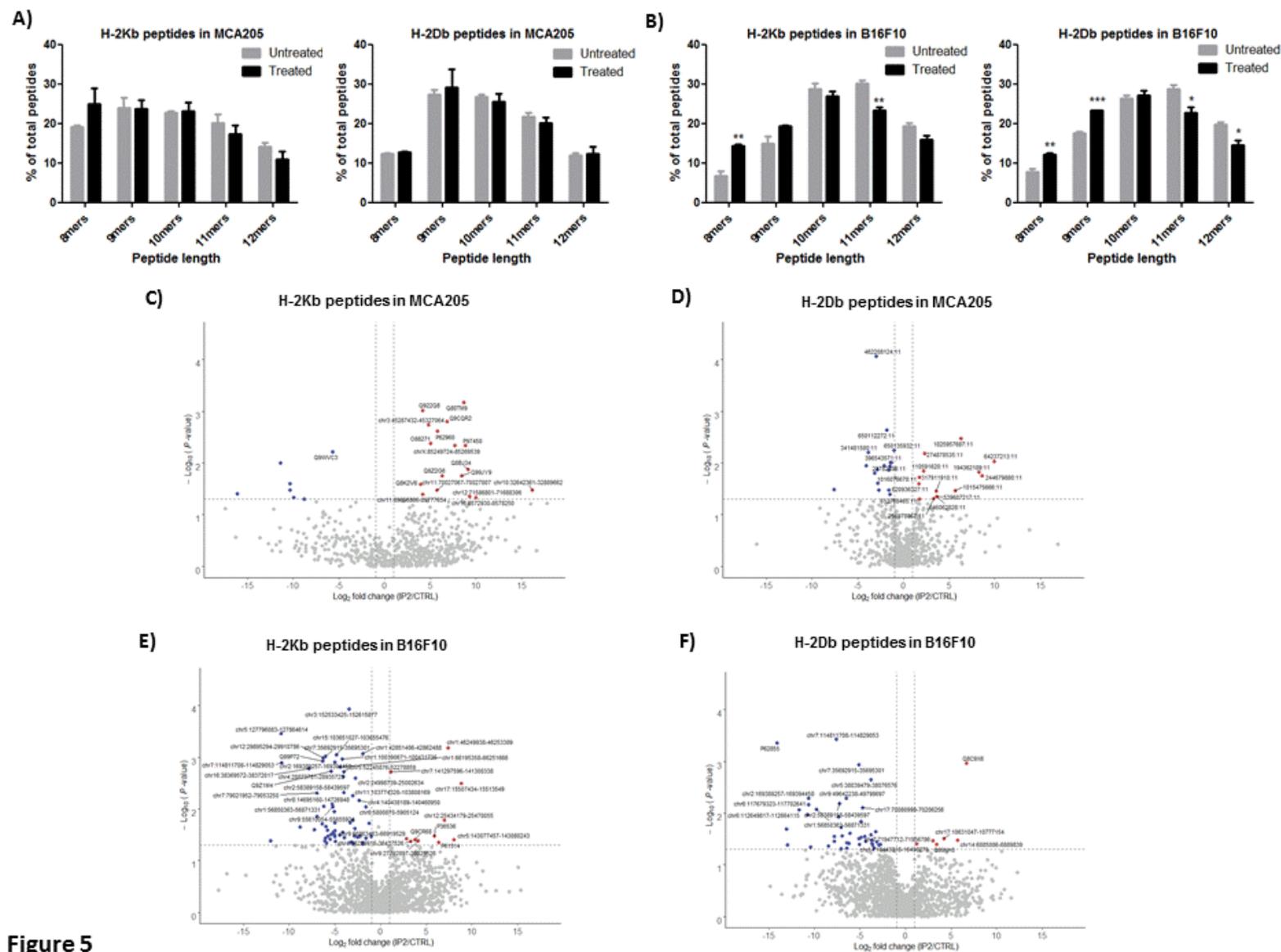
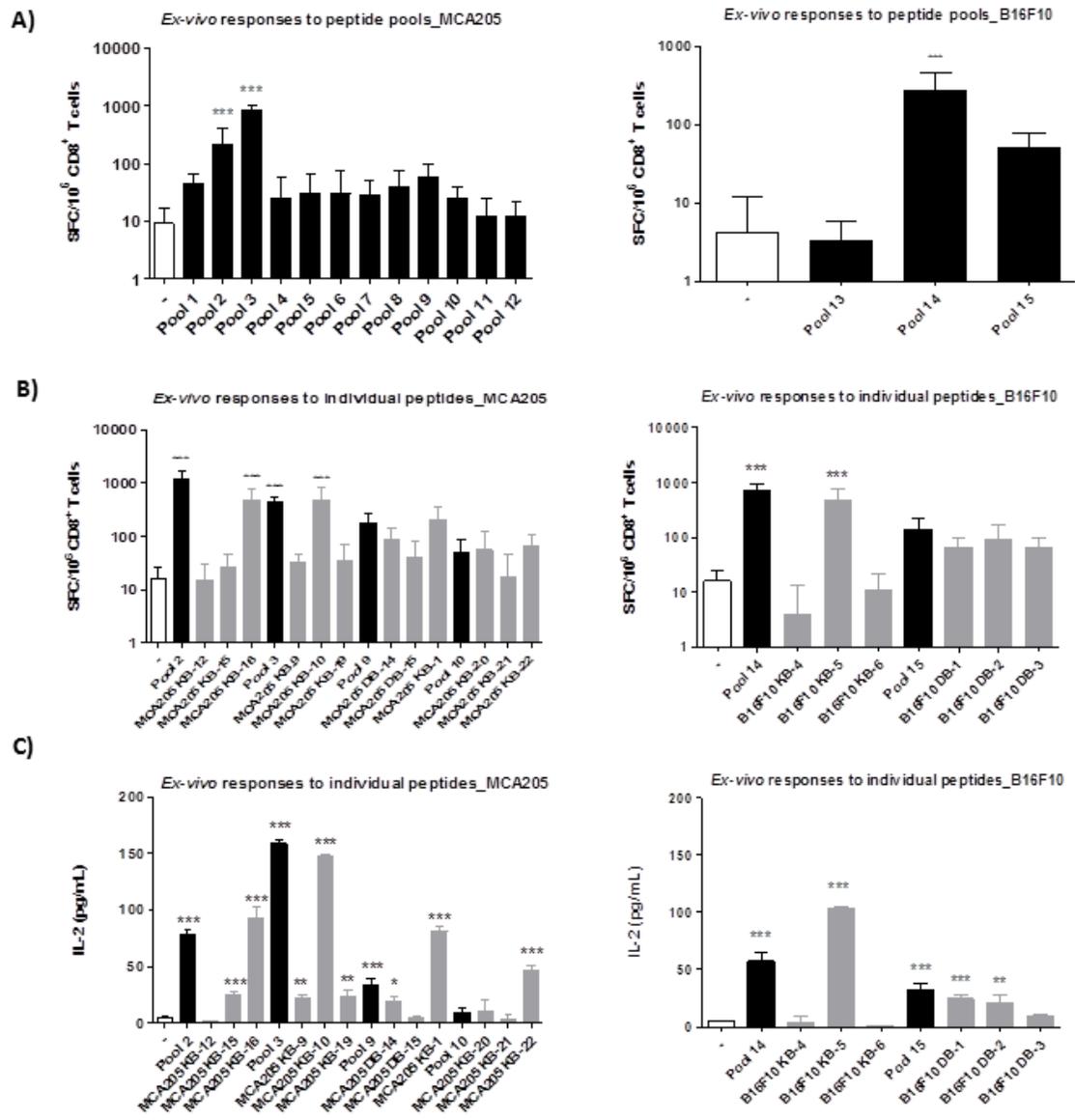
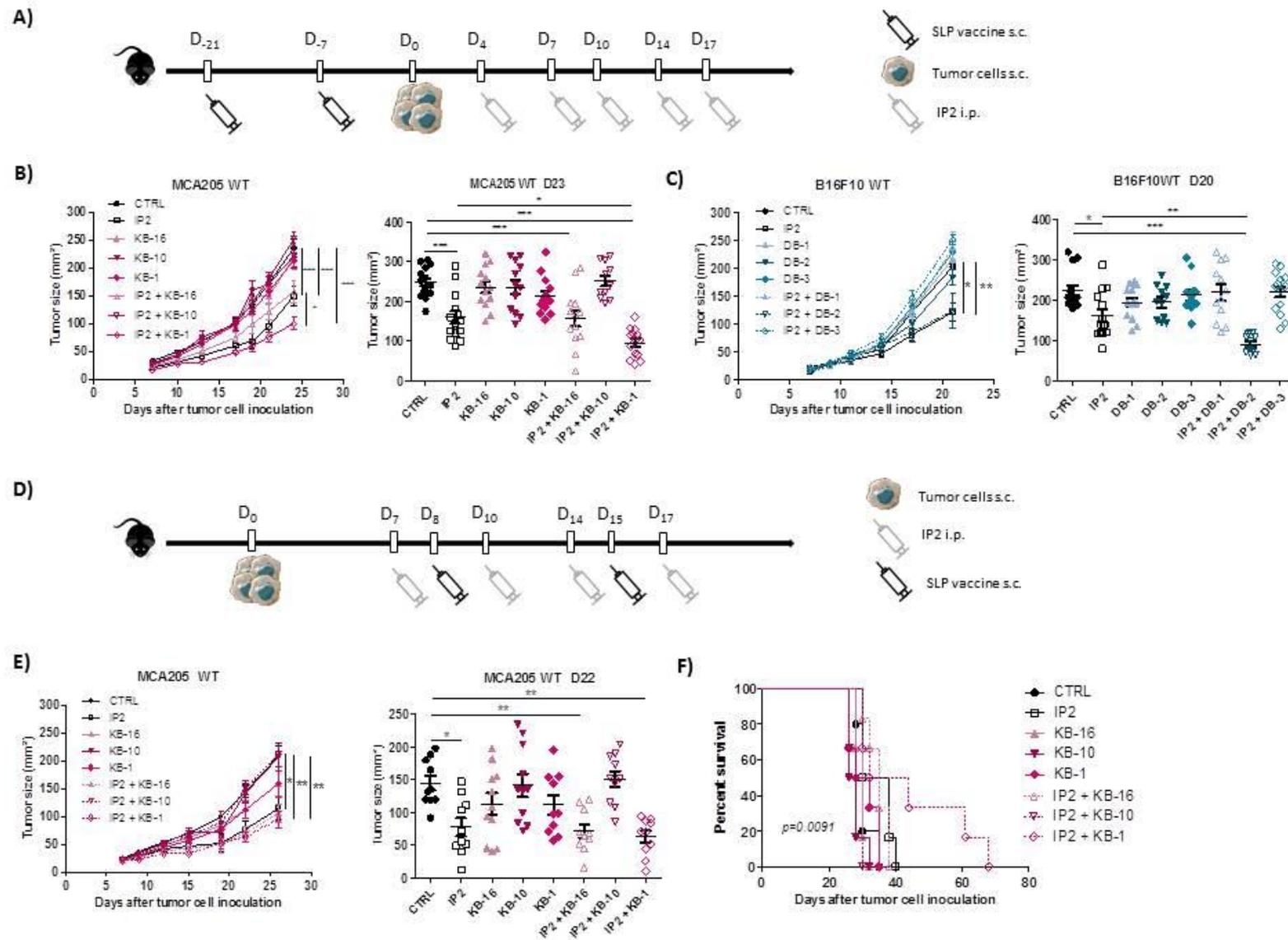


Figure 5



**Figure 6**



**Figure 7**

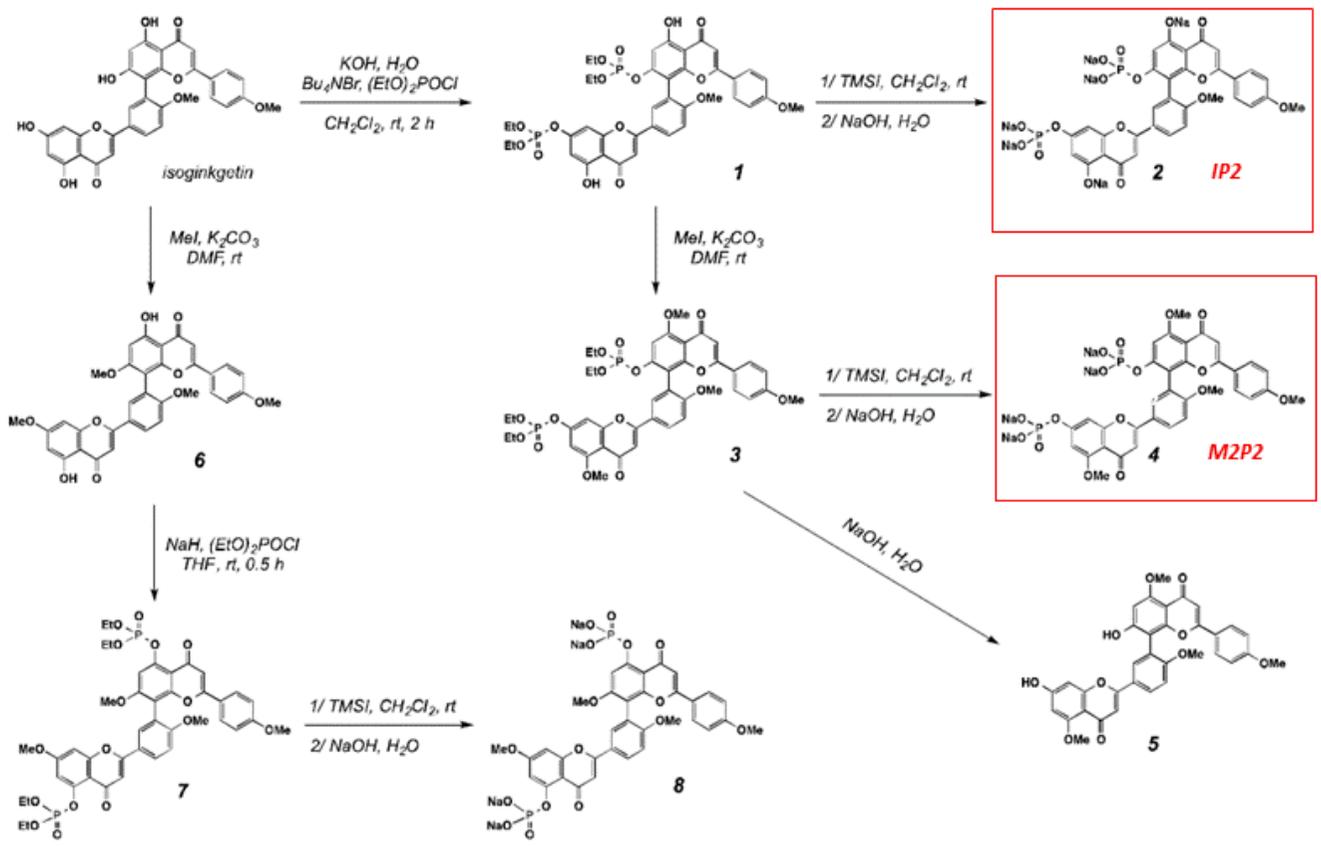


Figure S2

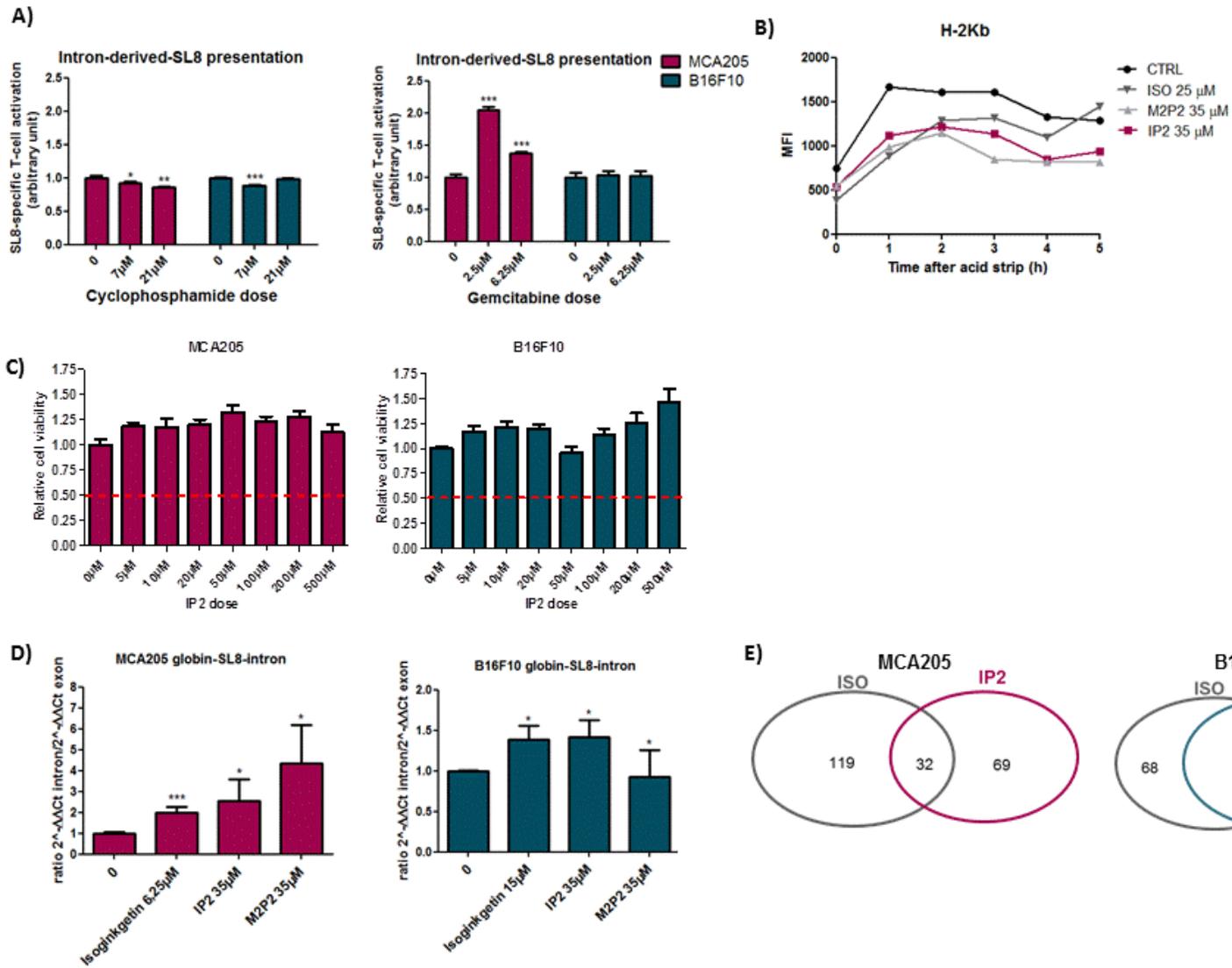


Figure S3

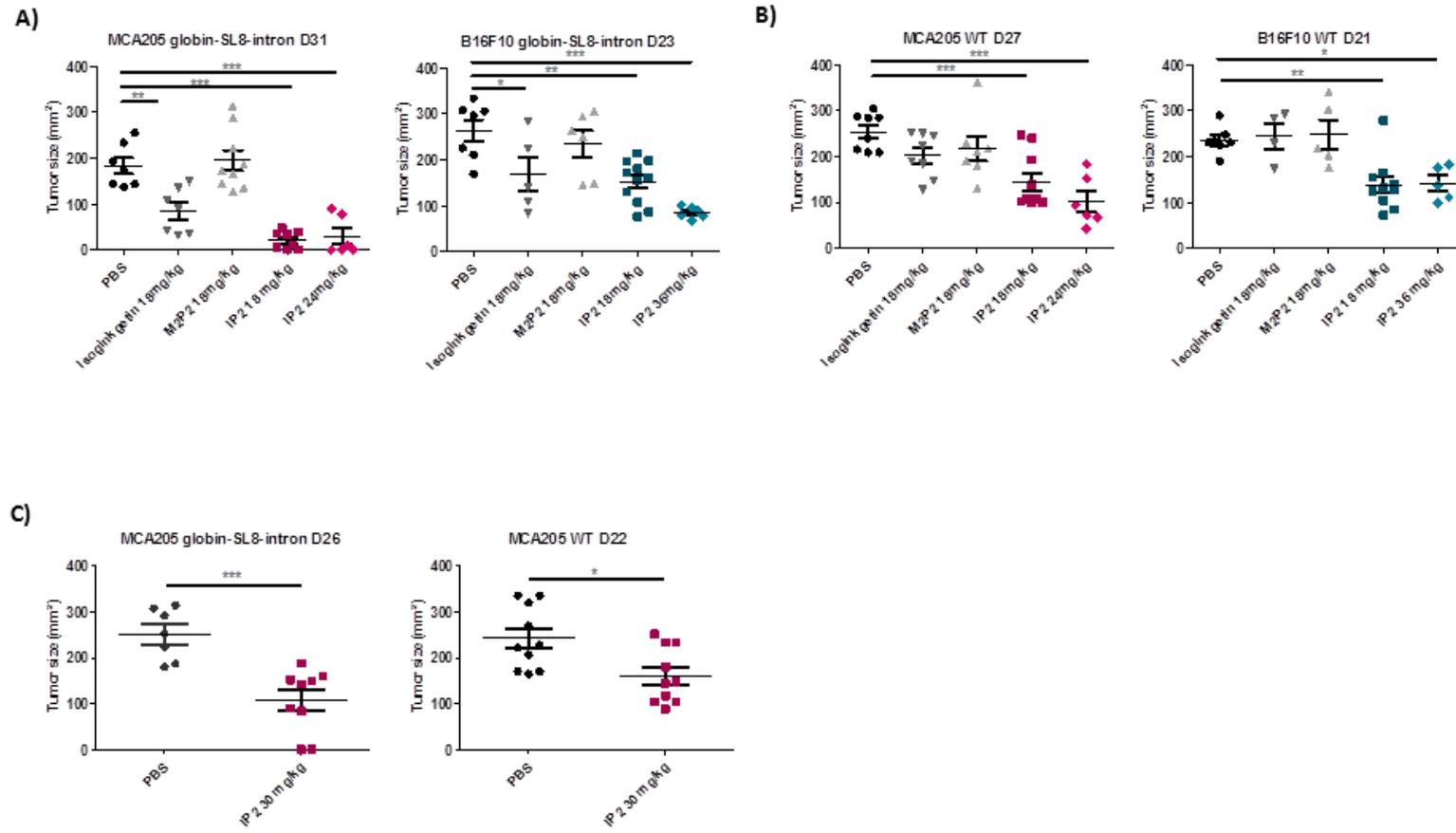


Figure S4

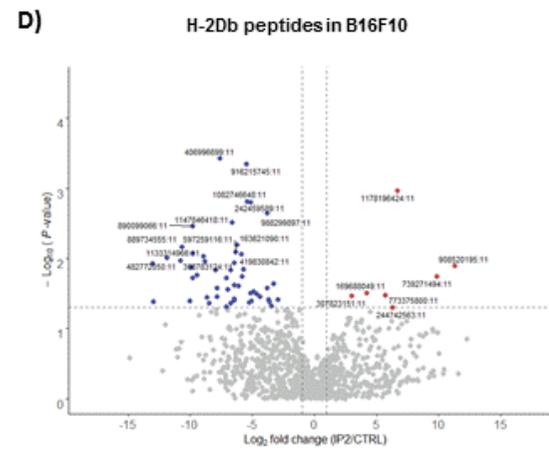
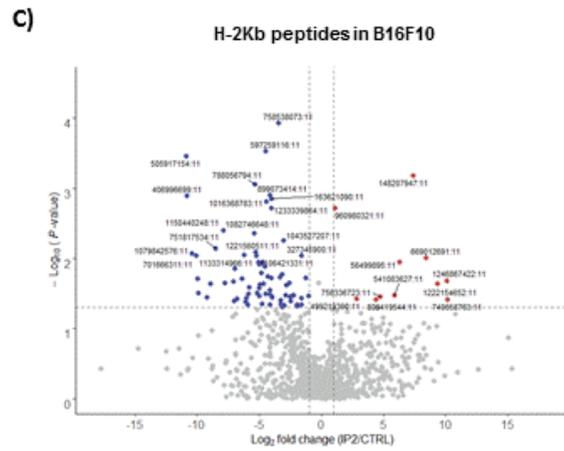
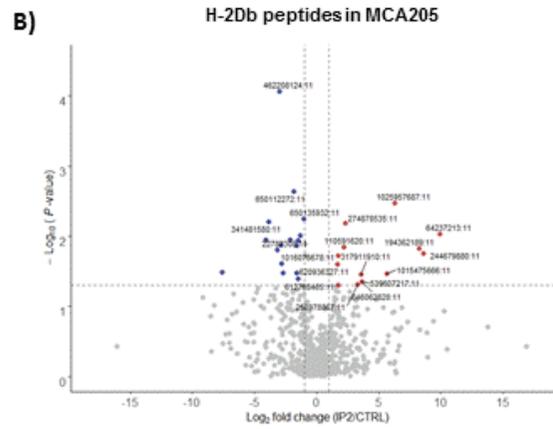
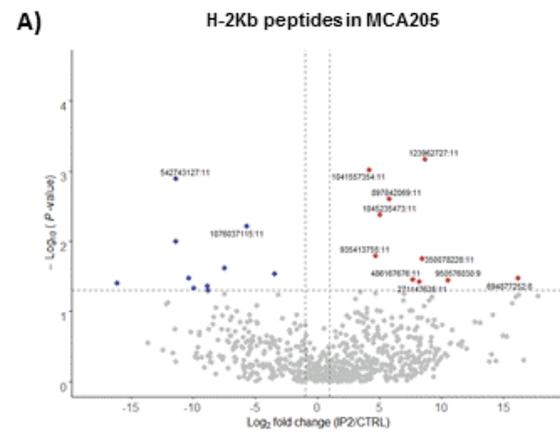


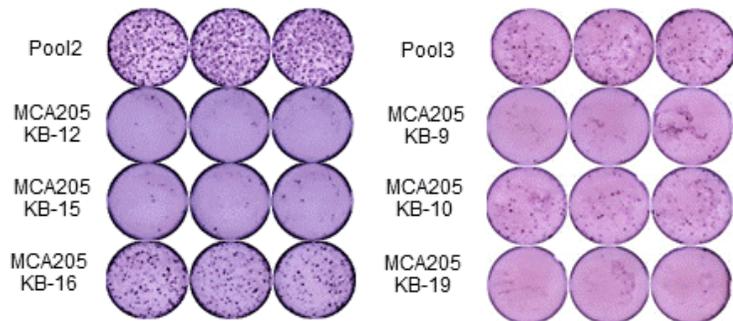
Figure S5

A)

MCA205 KB-1: GQIIFLPFTCIGYTD**TNQDFIQRL**STLIRQAIERQLPAW

MCA205 KB-22: GQIIFLPFTCIGYTA**TNQDFIQRL**STLIRQAIERQLPAW

B)



C)

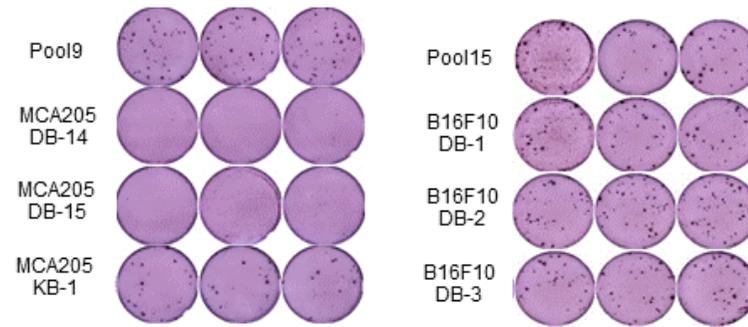


Figure S6

Database	Epitope sequence	Gene	Region	Alloantigen
MCA 205 "All frame"	YTTH/PH/PSEELY/SR	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	Exon	H-2Kb
	YWFVLWDFSVC	Serpinb9	Intron	H-2Kb
	SHASRTLPH/PPF	PDZ domain-containing protein GIPC1	Intron	H-2Kb
	VDWFPVFRDL	Transmembrane protein 43	Exon	H-2Kb
	FEESAVMVLN	Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	Intron	H-2Kb
	KQSVYK/TGSLPV	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	Intron	H-2Kb
	VLEIEPRPA/SCL	n.d.	Enhancer	H-2Kb
	VSPPLPQKP	n.d.	PFR	H-2Kb
	SLNKHKTR/LISC	TATA-box binding protein-associated factor 1D	intron	H-2Kb
	QFLDFQIV	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit Bdelta	Exon	H-2Db
	I/SLSIYAPARLA	Cyclin-F	Exon	H-2Db
MCA205 "Ret. Introns + Uniprot"	VWDFVMLRDI	Solute carrier family 38, member 6	Ret. Intron	H-2Kb
	EESFPGFVNL	Nesprin-1	Exon	H-2Kb
	NMWRSEDSK	Family with sequence similarity 129, member A	Ret. Intron	H-2Kb
	LDIPEQAGQR	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C12	Ret. Intron	H-2Kb
	PKTALAPHPK	Lysosomal Trafficking Regulator	Ret. Intron	H-2Kb
	SQKHIDFSLR	40S ribosomal protein S9	Exon	H-2Kb
	FQFDLQIV	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	Ret. Intron	H-2Db
	SIYAPARL	Cyclin F	Exon	H-2Db
	DSPPVRAVLSPS	Sec1 family domain containing 2	Ret. Intron	H-2Db

Database	Epitope sequence	Gene	Region	Alloantigen
B16F10 "All frame"	PPTIT/MSPSF	Histone-lysine N-methyltransferase EZH1	Intron	H-2Kb
	TIFNVLGKM	Ubiquitin specific peptidase 40	Intron	H-2Kb
	PTPHRKSFYWR	n.d.	PFR	H-2Kb
	PVRYTIKFIVF	Dedicator of cytokinesis protein 11	Intron	H-2Kb
	KLELPYAPPL	Transcription regulator protein BACH2	Intron	H-2Db
	LHPGSLPKF	Type II inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase	Intron	H-2Db
B16F10 "Ret. Introns + Uniprot"	TIFNVLGKM	Ubiquitin specific peptidase 40	Ret. Intron	H-2Kb
	PTVVTKPPFLQR	LncRNA predicted gene 48619	Ret. Intron	H-2Kb
	PPTLVGESF	Phospholipid phosphatase related 1	Ret. Intron	H-2Kb
	VEVEVRKPKRSN	Dipeptidyl peptidase like 10	Ret. Intron	H-2Kb
	KQQSARRLLPC	MRN complex interacting protein	Ret. Intron	H-2Kb
	HLPSPIGKF	Calmodulin-lysine N-methyltransferase	Ret. Intron	H-2Db
	APLAVTFARRT	LRR binding FLII interacting protein 1	Ret. Intron	H-2Db
	KLELPYAPPL	BTB domain and CNC homolog 2	Ret. Intron	H-2Db

**Table 1**

Accession number	Sequence	Gene	H-2Kb	H-2Db	Description
Q8K2V6	TIILFTKV	Importin-11	*		IEDB
Q922Q8	WVLQTDSSQ	Leucine-rich repeat-containing protein	*		Novel
chr11:89696866-89777634	LSPIPTAQRSLA	Ankyrin Repeat and Fibronectin Type III Domain Containing 1	*		Novel
chr3:45287432-45327064	MAYLRKQ	LncRNA 2610316D01	*		Novel
O88271	KVDFDFAGEEV	Craniofacial development protein 1	*		IEDB
Q9WVC3	VMYKFLTV	Caveolin-2	*		IEDB
chr11:70027067-70027807	ETLAAPSPVRPS	Discs Large MAGUK Scaffold Protein 4	*		Novel
P62960	TVKWFNVRNGYG	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	*		IEDB*
Q9Z2G6	QALKYFNL	Protein sel-1 homolog 1	*		IEDB
Q9CQR2	LAKADGIVSKNF	40S ribosomal protein S21	*		IEDB
chrX:85249724-85269539	ILEHLLVICLRT	Ferritin, heavy polypeptide-like 17, member A	*		Novel
Q99JY9	STPEFYQV	Actin-related protein 3	*		IEDB
Q80TM9	TNQDFIQRL	Nischarin	*		IEDB
P97450	DPKFEVIDKQPS	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	*		IEDB
Q8BJ34	LLELLEAIPAIL	Meiosis arrest female protein 1	*		Novel
chr12:71586801-71688306	ALNHKLMY	LncRNA 9630002D21	*		Novel
chr16:8572930-8578250	SSLLLLLEIV	4-Aminobutyrate Aminotransferase	*		Novel
chr10:32642361-32889662	LQLMLKTI	Sodium/Potassium Transporting ATPase Interacting 2	*		Novel
P11983	VRYINENL	T-complex protein 1 subunit alpha		*	IEDB
chr16:8844111-8855813	TLVRTPPPTK	RIKEN cDNA 1810013L24 gene		*	Novel
chr1:84870070-84881111	VGKTALPKVRS	F-box protein 36		*	Novel
Q91VJ2	PEKPVLIQESAA	Protein kinase C delta-binding protein		*	Novel
chr15:8636319-8639075	GLPPITVR	Solute carrier family 1 member 3		*	Novel
chr8:111472666-111476063	VVKLVIPPW	WD repeat domain 59		*	Novel
chr1:123905156-124045144	QLVTFREL	Dipeptidylpeptidase 10		*	Novel
P10853	SVYVYKVL	Histone H2B type 1-F/J/L		*	IEDB
chr15:83527321-83533563	LGVATRKAAGL	BCL2-interacting killer		*	Novel
chr5:140785592-140830013	PLRDPVSKLKQ	Guanine nucleotide binding protein, alpha 12		*	Novel
chr2:105731480-105792098	VFWCNSDEV	Elongator acetyltransferase complex subunit 4		*	Novel
chr19:3323354-3349208	DPVVTKPAGLI	Carnitine palmitoyltransferase 1a		*	Novel
chr6:125903089-125955718	AELQNLPTCGQ	Anoctamin 2		*	Novel
chr2:173228606-173234326	GLFLAGLGIS	Prostate transmembrane protein, androgen induced 1		*	Novel
chr18:37968775-37969374	GVGSGCWGSEQ	FCH and double SH3 domains 1		*	Novel
chr11:116462102-116465290	GLGSGKWTPL	Glutamine rich 2		*	Novel
chr10:86896673-86897959	AVPRPRHV	Stabilin 2		*	Novel
Q9Z1S0	AIITGFRNV	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta		*	IEDB
chr8:113777942-113844874	LFQFEILIFI	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 18		*	Novel
P11499	DEDASRMEEVD	Heat shock protein		*	IEDB

**Supplementary Table 1**

Accession number	Sequence	Gene	H-2Kb	H-2Db	Description
chr7:141297596-141300338	KSTLHHHPPAI	DEAF1, transcription factor	*		Novel
chr6:5800870-5905124	LVASLCPHRRQ	Dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1	*		Novel
chr1:42851406-42862488	LCIPGGIPSLE	Mitochondrial ribosomal protein S9	*		Novel
chr4:140438189-140460950	APLTLRAATPL	Predicted gene 13026	*		Novel
chr2:24998739-25002634	PPSLPPSFLSS	Patatin-like phospholipase domain containing 7	*		Novel
chr9:66863463-66919529	KTSILCVLIIV	RAB8B, member RAS oncogene family	*		Novel
chr11:103774328-103808169	GKPSTFVSLP	Wnt Family Member 3	*		Novel
chr4:36259916-36437526	FASGLPPLLCL	Leucine rich repeat and Ig domain containing 2	*		Novel
chr3:152533425-152615877	CRKAPHPGYV	Adenylate kinase 5	*		Novel
Q9CR68	TVGLNVPASVRF	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	*		IEDB
chr2:58389158-58439597	LPASGVVIVQP	Activin A receptor, type 1	*		Novel
chr5:52245876-52278859	TSLITPYPRQSL	RIKEN cDNA 9230114K14 gene	*		Novel
chr4:28873781-28935723	NVLEGRRS	Eph receptor A7	*		Novel
chr9:27792897-28029526	EEINPSLTNCY	Opioid binding protein/cell adhesion molecule like	*		Novel
chr1:100390671-100431735	LSRFISIVAFV	Contactin associated protein-like 5B	*		Novel
chr1:66195358-66251666	PWSRTKLS	Microtubule-associated protein 2	*		Novel
chr15:103651027-103655476	SLLGSFKNN	Predicted gene, 49272	*		Novel
chr2:169389257-169394458	FLPLPSLSP	Predicted gene 14250	*		Novel
chr8:14695160-14726948	KANLKVSTFV	DLG associated protein 2	*		Novel
Q9Z1M4	DARDLAKKF	Ribosomal protein S6 kinase beta-2	*		Novel
P36536	LGLDNAGKTTL	GTP-binding protein SAR1a	*		IEDB*
chr7:35692915-35695301	KVPLGVSQHHLA	Dpy-19-like 3	*		Novel
chr1:56850363-56871331	YITISYVRAFV	Special AT-rich sequence binding protein 2	*		Novel
chr12:29895294-29910786	PLAGPRGPPI	Myelin transcription factor 1-like	*		Novel
Q99P72	AAPVPPAAAPL	Reticulon-4	*		Novel
P61514	VGIVGKYGTRYG	60S ribosomal protein L37a	*		IEDB*
chr7:79021952-79053250	FGYLSHHA	Predicted gene, 26633	*		Novel
chr12:25434179-25470055	PTPALCTESI	Predicted gene, 36723	*		Novel
chr1:46249938-46253389	TYSTGFVLY	Dynein, axonemal, heavy chain 7B	*		Novel
chr16:38369572-38372017	ICSLPDREFFV	Popeye domain containing 2	*		Novel
chr5:143077457-143080243	APLALCLLLLFV	Ring finger protein 216	*		Novel
chr17:15507434-15513549	FGLLQRANITSP	TATA-box binding protein	*		Novel
chr7:114811708-114829053	LDPKIKPD	INSC spindle orientation adaptor protein	*		Novel
chr5:127796083-127864614	FLCISPLPLSKS	Transmembrane protein 132D	*		Novel
chr14:16443818-16498276	VANKIGII	60S ribosomal protein L23a		*	IEDB
chr7:71947712-71956786	VSISNSTYI	Predicted gene, 36633		*	Novel
Q99NH0	ASVLNVNHI	Ankyrin repeat domain-containing protein 17		*	IEDB
chr5:38039479-38076576	PEGAALYGLP	Syntaxin 18		*	Novel
chr17:10631047-10777154	VLNSLELELHT	PARK2 coregulated		*	Novel
chr17:70080999-70206256	YLHDIKKF	DLG associated protein 1		*	Novel
chr7:35692915-35695301	KVPLGVSQHHLA	Dpy-19-like 3		*	Novel
chr14:6885086-6889839	TAPAPAPATP	Predicted gene 3667		*	Novel
chr9:49642238-49798697	ALAPSVLPPLAA	Neural cell adhesion molecule 1		*	Novel
Q8C9X6	LAAAANCQVSKV	Enhancer of polycomb homolog 1		*	Novel
chr2:58389158-58439597	LPASGVVIVQP	Activin A receptor, type 1		*	Novel

chr7:114811708-114829053	LDPKIKPD	INSC spindle orientation adaptor protein	*	Novel
chr1:56850363-56871331	YITISYVRAFV	Special AT-rich sequence binding protein 2	*	Novel
chr2:169389257-169394458	FLPLPSLLEPF	Predicted gene 14250	*	Novel
chr6:117679323-117702641	VRNKVVICYSVI	RIKEN cDNA 1700030F04 gene	*	Novel
chr6:112649817-112664115	ALCGPLHGTLHP	RAD18 E3 ubiquitin protein ligase	*	Novel
P62855	AAPRPPPKPM	40S ribosomal protein S26	*	IEDB

## Supplementary Table 2

Accession number	Sequence	Gene	Region	H-2Kb	H-2Db	Description
1041557354:11	WVLQTDSSQ <b>G/StopA</b>	Leucine Rich Repeat Containing 59	Exon	*		Novel
935413755:11	TPSGLQTS <b>A</b> F	Bone Morphogenetic Protein 1	Intron	*		Novel
1045235473:11	KVDFDFAGEEV	Craniofacial Development Protein 1	Exon	*		IEDB
1076037115:11	YVMYKFLTV <b>C/FL</b>	Caveolin-2	Exon	*		IEDB*
897842069:11	SYWYWTYKEWE	Long Transient Receptor Potential Channel 7	Exon		*	Novel
486167676:11	LLFFLLHRHTV	Pyrophosphatase (Inorganic) 2	Intron	*		Novel
271147635:11	GRIWEELEE <b>V/GD</b>	Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family B Member 2	Intron	*		Novel
350078228:11	<b>I/ML</b> ASTPEFYQV	Actin Related Protein 3	Exon	*		IEDB*
123962727:11	TNQDFI <b>Q</b> RL	Nischarin	Exon	*		IEDB
950576030:9	TTQRDPSML	n.d.	Enhancer	*		Novel
542743127:11	LHFTG <b>I</b> ED	Protein Kinase C Alpha	Intron	*		Novel
694877252:8	QILML <b>K</b> T	PPARG Coactivator 1 Alpha	Intron	*		Novel
650135932:11	PPKKKGG <b>I</b> P	Coiled-Coil Domain Containing 88C	Intron		*	Novel
22782308:11	AKLHFL <b>V/G</b> HTIL	LUC7 Like 2, Pre-mRNA Splicing Factor	Intron		*	Novel
620936327:11	PEKARPL <b>L</b> TQE	Ribosomal Protein S8	Intron		*	Novel
1016076678:11	VV <b>K</b> LVIPPW	WD Repeat Domain 59	Intron		*	Novel
612768465:11	PALARVASE <b>P</b> A	Proline Rich 3	Exon		*	Novel
650112272:11	PPKGLGP <b>V</b> LH	A-Kinase Anchoring Protein 1	Exon		*	Novel
110591620:11	DL <b>A/T</b> NVYVD <b>V/AL/VK</b>	Apolipoprotein A1	Exon		*	Novel
274878535:11	GSCR <b>S</b> CCRQV	Myelin Expression Factor 2	Exon		*	Novel
462208124:11	LGFL <b>A/PG</b> AVVTF	High mobility group AT-hook 1	Exon		*	Novel
256978867:11	GLRDPFL <b>T</b> P	Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator Like 1	Intron		*	Novel
317911910:11	HRLVEKE <b>F</b> RIR	Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 23	Intron		*	Novel
539607217:11	TG <b>T</b> KHANIC	Peroxisomal Trans-2-Enoyl-CoA Reductase	Intron		*	Novel
846062828:11	SMD <b>S</b> KSSGWGM	TAR DNA Binding Protein	Exon		*	IEDB
341481580:11	IGPRR <b>P</b> VH	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit D	Intron		*	Novel
1015475666:11	<b>V/L</b> VFSNVNLKEV	Damage Specific DNA Binding Protein 1	Exon		*	IEDB*
1025957687:11	W <b>F</b> I/NKSPWF <b>T</b> T	Karyopherin Subunit Alpha 1	Intron		*	Novel
194362189:11	FLIM <b>K/Stop</b> PLHRQI	Mitochondrial Trans-2-Enoyl-CoA Reductase	Intron		*	Novel
244679880:11	G <b>H</b> L/PSYYLVVEE	Dystrobrevin Binding Protein 1	Intron		*	Novel
64237213:11	C <b>F</b> C/FPEVQTYFS	Trafficking Kinesin Protein 2	Intron		*	Novel

Supplementary Table 3

Accession number	Sequence	Gene	Region	H-2Kb	H-2Db	Description
960980321:11	SIVPH <b>T</b> /RRP <b>H</b> PP	AT-Rich Interaction Domain 1B	Intron	*		Novel
327345900:11	GTIVFP <b>T</b> WIVF	SRY (sex determining region Y)-box 5	Intron	*		Novel
499219390:11	KTMK <b>L</b> KGALLG	Trimethyllysine Hydroxylase, Epsilon	Intron	*		Novel
1043527207:11	ALPSR <b>P</b> TYK	Transmembrane protein, adipocyte associated 1	Intron	*		Novel
758538073:11	PPPTKG <b>Q</b> TSS	Discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	Intron	*		Novel
163621090:11	IPAPG <b>K</b> Q <b>G</b> R	Jpx transcript, Xist activator	lncRNA	*		Novel
1233339864:11	YLLLSWP <b>Q</b> RSL	Rap guanine nucleotide exchange factor 4	Intron	*		Novel
899073414:11	RRRREGR <b>K</b> IMR	Neuron navigator 3	Intron	*		Novel
809419544:11	QKDPNS <b>K</b> HPEC	Signal Transducing Adaptor Molecule	Intron	*		Novel
1016368783:11	SQAQIG <b>K</b> RDS	Tyrosinase-related protein 1	Intron	*		Novel
597259116:11	PVRSV <b>Q</b> SHSM	PTPRF Interacting Protein Alpha 1	Intron	*		Novel
756336723:11	PPH <b>L</b> P <b>Q</b> R <b>H</b> V <b>F</b>	n.d.	Intergenic DNA	*		Novel
1106421331:11	TVLTSI <b>Q</b> L <b>T</b> FV	S phase cyclin A-associated protein in the ER	Intron	*		Novel
1221560511:11	EKLGL <b>I</b> STFV	Coiled-coil domain containing 173	Intron	*		Novel
788056794:11	PWSQHY <b>H</b> QGY <b>Y</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Intron	*		Novel
1082746648:11	AR <b>D</b> LAK <b>K</b> F	Ribosomal protein S6 kinase beta-2	Exon	*		Novel
541083627:11	GLDNAG <b>K</b> TTI	GTP-binding protein SAR1a	Exon	*		IEDB
1133314966:11	VH <b>A</b> V <b>K</b> W <b>K</b> M <b>S</b> V <b>F</b>	HAUS augmin-like complex, subunit 6	Exon	*		Novel
56499895:11	ATHSS <b>R</b> <b>F</b> <b>L</b> /I <b>P</b> L <b>K</b>	40S ribosomal Protein S15	Exon	*		Novel
148207947:11	E <b>A</b> N <b>D</b> L <b>N</b> <b>V</b> /F <b>L</b> <b>Y</b>	Ubiquitin Specific Peptidase 47	Intron	*		Novel
1150440248:11	VL <b>V</b> T <b>Q</b> S <b>N</b> P <b>N</b> A	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14	Intron	*		Novel
669012691:11	M <b>V</b> <b>K</b> <b>L</b> /H <b>Q</b> L <b>R</b> L <b>A</b> Q <b>F</b>	Transmembrane Protein 199	Exon	*		Novel
751817534:11	P <b>M</b> D <b>L</b> <b>K</b> F <b>A</b> R <b>I</b> I <b>W</b>	RAD51 paralog B	Intron	*		Novel
1222154652:11	Y <b>F</b> CF <b>Y</b> MY <b>D</b>	LUC7 Like 2, Pre-mRNA Splicing Factor	Intron	*		Novel
701666311:11	NS <b>F</b> PI <b>E</b> TR <b>D</b> PS	Plexin B1	Exon	*		Novel
1246867422:11	Y <b>T</b> L <b>F</b> Y <b>N</b> I <b>Y</b> I <b>Y</b> I	Discs Large MAGUK Scaffold Protein 3	Exon	*		Novel
740658763:11	P <b>K</b> D <b>P</b> <b>M</b> /R <b>D</b> PE <b>E</b> L	Oxysterol Binding Protein Like 5	Exon	*		Novel
1079842576:11	V <b>K</b> V <b>G</b> V <b>N</b> G <b>F</b> G	Aging-associated gene 9	Exon	*		IEDB
406996699:11	L <b>D</b> P <b>K</b> I <b>K</b> P <b>D</b>	INSC spindle orientation adaptor protein	Intron	*		Novel
505917154:11	K <b>Y</b> G <b>K</b> V <b>F</b> G <b>L</b> F <b>V</b> <b>F</b> /V	NOP58 ribonucleoprotein	Intron	*		Novel
307823151:11	Q <b>W</b> <b>A</b> /S <b>P</b> N <b>S</b> P <b>A</b> I	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type M	Exon		*	Novel
988299897:11	P <b>E</b> G <b>A</b> A <b>L</b> Y <b>G</b> L <b>P</b>	Syntaxin 18	Intron		*	Novel
169688049:11	E <b>L</b> K <b>T</b> L <b>M</b> H <b>V</b> S <b>L</b> P	Ubiquitin Specific Peptidase 3	Intron		*	Novel
242459589:11	R <b>D</b> W <b>K</b> L <b>P</b> D <b>R</b> S <b>S</b>	Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	Intron		*	Novel
1082746648:11	AR <b>D</b> LAK <b>K</b> F	Ribosomal protein S6 kinase beta-2	Exon		*	Novel
916215745:11	R <b>V</b> W <b>R</b> E <b>Q</b> R <b>K</b> Y <b>T</b> I	Dipeptidylpeptidase 8	Exon		*	Novel
773375800:11	P <b>S</b> L <b>S</b> P <b>P</b> A <b>A</b> P <b>G</b> P	Glutaminase	Exon		*	Novel
419830842:11	P <b>V</b> G <b>V</b> G <b>L</b> N <b>P</b> V <b>N</b>	Aspartate-beta-hydroxylase	Intron		*	Novel
163621090:11	IPAPG <b>K</b> Q <b>G</b> R	Jpx transcript, Xist activator	lncRNA		*	Novel
244742563:11	F <b>R</b> V <b>F</b> L <b>F</b> L <b>R</b> Q <b>S</b> L	Integrin Subunit Alpha 11	Intron		*	Novel
597259116:11	PVRSV <b>Q</b> SHSM	PTPRF interacting protein alpha 1	Intron		*	Novel
1147846418:11	V <b>L</b> Q <b>F</b> V <b>A</b> M <b>W</b> L <b>W</b> I	NUMB endocytic adaptor protein	Exon		*	Novel
1178196424:11	V <b>V</b> G <b>A</b> E <b>S</b> N <b>L</b> V <b>M</b> <b>R</b> /K	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1	Intron		*	Novel
406996699:11	L <b>D</b> P <b>K</b> I <b>K</b> P <b>D</b>	INSC spindle orientation adaptor protein	Intron		*	Novel
308783124:11	G <b>P</b> V <b>C</b> P <b>K</b> A <b>A</b> I <b>P</b>	Ubiquitin protein ligase E3B	Exon		*	Novel

1133314966:11	VHAVKWKMSVF	HAUS augmin-like complex, subunit 6	Exon	*	Novel
890099066:11	RPRKQASIRIY	E3 Ubiquitin-Protein Ligase HERC2	Intron	*	Novel
739271494:11	PIQTISYSKVS	SS18 Subunit Of BAF Chromatin Remodeling Complex	Intron	*	Novel
889734555:11	RPPTRPYFLVF	Clathrin interactor 1	Intron	*	Novel
908520195:11	RTGKFIERKNR	Coiled-Coil Domain Containing 141	Intron	*	Novel
482772050:11	KPHLKHSRAFQ	Oxysterol binding protein-like 8	Intron	*	Novel

#### Supplementary Table 4

Immunization pool	ID	SLP sequence (Epitope)
Pool 1	MCA205 KB-2	PSKARYSALSMIFEESAVMVLNMATQAHWLSKWGAAT
	MCA205 KB-6	RQDSAVTWLLCAFPKQSVYKGSPLVQSSRRVSASVALPQ
	MCA205 KB-11	VSSRTARTTQRAAVSLNKHKTRISCRAVVAAHAFAPS
Pool 2	MCA205 KB-12	LVFSQRGPEEDPLASVPSPLPQKPASPIKCKKWSTASQ
	MCA205 KB-15	YLSHIGAIYCALQTTQRDPSMLAAPTWSAKQAKTRPKP
	MCA205 KB-16	ETSFHYHTWLYMWVLEIEPRPAELCGEHITDAVSYPP
Pool 3	MCA205 KB-9	PTMMYQWAQSLHHFAQILMLKTLATLAGHREIQLQVHA
	MCA205 KB-10	PPRLTDAFAAGAVPLSHASRTLPPFPGRAPQFLRLAQ
	MCA205 KB-19	LPAGVFCILAVIQDYTTTHSEELYRDLVAKLKPYIRAAQ
Pool 4	MCA205 KB-13	QPLATGPMAIPEGSYWYWTYKEWEKTGPTHLEEKLKKK
	MCA205 KB-17	DNAVQGLRHHEILQWVLQTDSSQGAHPQHPLPSSLGAWI
	MCA205 KB-18	DELDPRESEKVKITKVFDFAGEEVRAEGPRGWKR VLSQ
Pool 5	MCA205 KB-3	LMIKSKEGGGLGAMGRIWEELEEVDHAQDILYEEDYLSI
	MCA205 KB-5	THHMQWYAVWFGGSILASTPEFYQVCHTKKDYEEIGPSI
	MCA205 KB-7	SELYIRTRYSILALLFFLLHRHTVQPKVSETAAAVFPR
Pool 6	MCA205 DB-1	HSTLKVLSGLLGWVCFCEVQTYFSTYRTCHIKCLL SRC
	MCA205 DB-5	GLHPMWPSTSGTFFLIMKPLHRQILGAGHTLDFPLPKL
	MCA205 DB-9	HLC SFLCELTLHTILSIYAPARLASAALLLARLMHGQS
Pool 7	MCA205 DB-7	KGQKGHSTGAGDRIGLRDPFLTPASCGLSLRKKGRRFAL
	MCA205 DB-8	PPLPKLIRLTQLKHRLVEKEFRIRLAAICTLAKFLAG
	MCA205 DB-10	KEATPLASSQMVPLTGTKHANICVCGSHSLSAHCIRPP
Pool 8	MCA205 DB-2	WQQDEPQSQWDKVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFESS
	MCA205 DB-11	PLSKSPCFARFSSSPALARVASEPASSAISLSPVAAGQ
	MCA205 DB-12	ITTPKDTFSSPALPPEKARPLLTQEEPQAGTHQACSSPT
Pool 9	MCA205 KB-1	GQIIFLPFTCIGYTD TNQDFIQRLSTLIRQAIERQLPAW
	MCA205 DB-14	CSDRPTVIYSSAHKVVFSNVNLKEVAYMCPLASDGY PDR
	MCA205 DB-15	PAGFSFPVPLVPRTVVKLVIPWVSFTFLISLCRASHCCD
Pool 10	MCA205 KB-20	GPTPSAKPSAFPLSVWDFVMLRDILAHARNRTRGQVA
	MCA205 KB-21	SIDSVRLEHKLAEESFPGFVNLNSTETQTAGVIDRW
	MCA205 KB-22	GQIIFLPFTCIGYTA TNQDFIQRLSTLIRQAIERQLPAW
Pool 11	MCA205 KB-23	HMQRYAVWFGGSMLASTPEFYQVCHTKKDYEEIGPSIC
	MCA205 KB-24	GSMYYNGIGVKRDYKQALKYFNLASQGGHILAFYNLAQ
	MCA205 KB-25	EHFNTCFAKHSLPRLDIPEQAGQRSTTQASKKFTHGDS
Pool 12	MCA205 KB-26	FAKVTDLPVAIPLRPKTALAPHPKTAADAVKDALLEPC
	MCA205 KB-27	KQVVNIPSFIVRLDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRK
	MCA205 DB-16	LCSFLCELTLHTLSIYAPARLASAALLLARLMHGQT
Pool 13	MCA205 DB-17	ASLGESTTVANCNDSPPVRAVLSPSAKHPHVVCALLSI
	B16F10 KB-2	QVQPSRQMWQTKIHSPTLVGESFQWSPAKQSFSGSQA H
	B16F10 KB-3	TVQVAASVSSETKVEVEVRKPKRSNGLCVHICKIMLD
Pool 14	B16F10 KB-4	MTEVRHCAFLAGSKQQSARLLPCYTVGHKKTRGAAGC
	B16F10 KB-5	YRAYGSQKAMLSVSS TYSTGFVLYKYSYSVFLYIYNLNI
	B16F10 KB-6	IVIKTMGPTSLPSLPTPALCTESILAPGGGAGWGGLEP
Pool 15	B16F10 DB-1	LSELLRAWLFDWPALHLPSPIGKFC LRWLLDPSQNSQMG
	B16F10 DB-2	GRASSYGLAHRDPAPLAVTFARRTEEGLEQLLVFDLNC
	B16F10 DB-3	AEIVPLKRLRTRKAKLELPYAPPLEEMAI SARQRATCL

**Titre : Immunomodulateurs de la voie de présentation antigénique par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I) aux propriétés antitumorales.**

**Mots clés :** CMH-I, présentation antigénique, antigènes tumoraux, immunopeptidome, PTPs, vaccin

Le succès des vaccins thérapeutiques contre le cancer repose sur l'établissement d'une réponse cellulaire adaptative efficace dirigée contre les antigènes présentés par les cellules tumorales dans les molécules du CMH. Les antigènes ciblés sont des antigènes associés à la tumeur (TAAs) ou des néoantigènes spécifiques de la tumeur (TSAs) qui peuvent être produits à partir des séquences exoniques du génome mais également des séquences présumées non-codantes par des événements de traduction non-canoniques. Les Pioneer Translation Products (PTPs) sont par exemple produits par un événement de traduction non-conventionnelle se déroulant dans le compartiment nucléaire sur des ARNm prématures avant l'épissage des introns. Nous avons mis en évidence les propriétés immunomodulatrices de l'inhibiteur de l'épissage isoginkgetine et de son dérivé hydrosoluble et non toxique, IP2.

Le composé IP2 augmente la présentation des peptides dérivés des PTPs *in vitro* et exerce une activité antitumorale dépendante du système immunitaire *in vivo*. Nous avons identifié par spectrométrie de masse les TAAs et les TSAs induits par IP2 à la surface des cellules tumorales. Nous avons trouvé des antigènes dérivant de séquences exoniques mais également d'introns retenus. Nous avons évalué l'immunogénicité de ces peptides *ex vivo* avant de tester leurs propriétés antitumorales *in vivo* dans le cadre de stratégies de vaccination prophylactique et thérapeutique. Finalement nous proposons une nouvelle immunothérapie antitumorale qui consiste à combiner le composé immunomodulateur IP2 qui augmente la présentation antigénique par les cellules tumorales avec un vaccin peptidique qui stimule la prolifération de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques des antigènes tumoraux.

**Title: Immunomodulators of the Major Histocompatibility Complex class I (MHC-I) antigen presentation pathway with antitumor properties.**

**Keywords :** MHC-I, antigen presentation, tumor antigens, immunopeptidome, PTPs, vaccine

Success of therapeutic cancer vaccines relies on the establishment of an effective adaptive immune response directed against antigens presented by cancer cells within MHC molecules. Targeted antigens are tumor associated antigens (TAAs) and tumor specific neoantigens (TSA) that can derive from both coding and allegedly non-coding regions of the genome through non-canonical translation events. Pioneer Translation Products (PTPs) are for instance produced by a non-conventionnal translation event taking place within the nucleus on pre-mature mRNA before the splicing of introns. We have highlighted the immunomodulatory properties of splicing inhibitor isoginkgetine and its water soluble and safe derivative, IP2.

IP2 enhances PTP-derived antigen presentation *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* in an immune-dependant manner. We have identified by mass spectrometry TAAs et TSAs induced by IP2 at the surface of cancer cells. We found antigens derived from both exons and retained introns. We assessed their immunogenicity *ex vivo* before testing their antitumor properties *in vivo* in the context of prophylactic and therapeutic cancer vaccines. Eventually, we propose a new immunotherapy consisting in the combination of IP2 compound that enhances antigen presentation in tumor cells with a peptide vaccine that boost the proliferation of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells specific for tumor antigens.