Etude de la réponse T CD4 anti-télomérase périphérique dans les cancers : méthodes d'analyse et intérêt pour le monitoring en immuno-oncologie

Caroline Laheurte

▶ **To cite this version:**

Caroline Laheurte. Etude de la réponse T CD4 anti-télomérase périphérique dans les cancers : méthodes d'analyse et intérêt pour le monitoring en immuno-oncologie. Immunologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCE002 . tel-03619200

HAL Id: tel-03619200

https://theses.hal.science/tel-03619200v1

Submitted on 25 Mar 2022

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.

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

Préparée à l'UMR 1098 Right, EFS BFC

Ecole doctorale n°554

Environnement, Santé

Doctorat de : Sciences de la Vie, Immunologie

Par

Caroline LAHEURTE

Etude de la réponse T CD4 anti-télomérase périphérique dans les cancers : Méthodes d'analyse et intérêt pour le monitoring en immuno-oncologie

Thèse présentée et soutenue à Besançon le 24 mars 2020

Composition du Jury :

Dr GOUTTEFANGEAS Cécile, Université de Tübingen, Allemagne	Rapporteur
Pr TARTOUR Eric, Université de Paris	Rapporteur
Pr CHAPUT Nathalie, Université de Paris Saclay	Examinateur
Pr LADOIRE Sylvain, Université de Bourgogne Franche-Comté	Examinateur
Pr ADOTEVI Olivier, Université de Bourgogne Franche-Comté	Directeur de thèse
Pr SAAS Philippe, Université de Bourgogne Franche-Comté	Président du jury

Remerciements

Je souhaite témoigner ma reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie le Docteur Cécile Gouttefangeas et le Professeur Eric Tartour pour leur travail de rapporteur de ma thèse, merci pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit et à son évaluation. Un grand merci aux examinateurs de ma thèse, les professeurs Nathalie Chaput et Sylvain Ladoire.

Je remercie le Professeur Philippe Saas, de m'avoir confié la coordination de la plateforme de Biomonitoring de l'EFS et d'avoir accepté ma volonté de réaliser cette thèse au sein de l'UMR 1098. Merci pour la confiance que vous m'accordez au quotidien.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Olivier Adotévi, pour son encadrement durant ces années de thèse. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse au sein de l'équipe TIM-C. C'est un vrai plaisir d'apprendre à tes cotés, toujours dans la bonne humeur et avec la positive attitude, ta passion pour la recherche est communicative.

Je tiens à adresser toute ma gratitude à l'ensemble de l'UMR1098. Mes remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe de la plateforme de Biomonitoring. Particulièrement, je remercie Gaëlle, Adeline, Eléonore et Laura qui ont contribué à ces travaux. Merci également à Kiki, Harmonie et Anne pour leur implication dans le fonctionnement au quotidien de la plateforme.

Je remercie l'équipe du CIC 1431, et l'équipe de méthodologie et de qualité de vie (UMQVC), notamment Marion, Dewi et Aurélia, pour la gestion des cohortes et l'analyse des données.

Merci aux équipes médicales de l'Institut Régional Fédératif de Cancérologie et en particulier l'équipe d'oncologie médicale du CHU de Besançon.

Merci à Justine et Laura, pour leur relecture.

A Sarah, et nos petits cafés-bavardages, merci pour ta présence, ton soutien et ton amitié.

A tous ceux aussi qui sont partis de l'UMR vers d'autres aventures mais qui ont été d'une aide précieuse, en particulier Béatrice Gaugler, mon ancienne responsable qui m'a appris les rouages de l'EFS et m'a coachée pendant plusieurs années à mon arrivée à la plateforme. Merci à Elodie Lauret Marie Joseph avec qui ce fut un réèl plaisir de travailler, merci pour ta gentillesse.

Je souhaite également remercier mes proches et ma famille ; à mes grands parents et parents qui m'ont aidé et soutenu depuis le début de mes études et dans mon parcours professionnel. Merci pour les valeurs de travail que vous m'avez inculquée.

A mon petit Nanou, à mon Lonlon et à notre « petite » famille qui s'agrandit à vue d'œil…

Je dédie ce travail de thèse à ma maman.

Titre : Etude de la réponse T CD4 anti-télomérase périphérique dans les cancers : Méthodes d'analyse et intérêt pour le monitoring en immuno-oncologie

Mots clés : lymphocytes T CD4, télomérase, ELISpot, cancer, immunothérapie

Résumé : Les immunothérapies ciblant les immune checkpoints ont bouleversé la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer. Le principe repose sur leur capacité à réactiver les réponses immunitaires anti-tumorales de l'hôte. Ainsi la détection des lymphocytes T dirigés contre des antigènes tumoraux dans le sang périphérique suscite un grand intérêt pour évaluer de manière dynamique l'immunité anti-tumorale chez le patient atteint de cancer.

Dans ce projet de thèse, nous avons dans un premier travail, étudié les caractéristiques immunologiques de la réponse CD4 Th1 anti-TERT circulante dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) et évalué sa relevance clinique. Pour cela, nous avons utilisé des collections de lymphocytes issus de patients atteints de CBNPC (n= 170) inclus dans la cohorte TeloCap1. Les réponses CD4 Th1 anti-TERT ont été mesurées par méthode ELISpot IFN-γ. Les réponses T CD4 anti-TERT circulantes étaient présentes chez 35% des patients. Les LT CD4 anti-TERT circulants produisaient de l'IFN-γ, du TNF-α et de l'IL-2 et exprimaient CXCR3, caractéristiques d'une polarisation Th1.

Sur le plan clinique, nous avons noté une corrélation inverse entre le stade du cancer et la prévalence de la réponse anti-TERT Th1. Cette prévalence diminue au fur et à mesure que le stade de la maladie avance, passant de 55% pour les stades localisés à 24% chez les métastatiques. De plus, une forte réponse Th1 anti-TERT circulante était associée à une meilleure survie globale chez les patients.

En étudiant les facteurs pouvant influencer la réponse Th1 anti-TERT périphérique, nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre la réponse CD4 Th1 anti-TERT, le taux des lymphocytes T circulants coexprimant PD-1 et TIM-3. Ainsi, nous avons montré que la présence d'une forte réponse Th1 anti-TERT limite l'effet délétère de l'accumulation des lymphocytes T PD-1+/TIM-3+.

Par conséquent en utilisant les taux circulants de ces deux paramètres immunologiques, il était possible de stratifier les patients atteints de CBNPC selon différents groupes pronostiques.

Dans un second travail qui fait suite au premier, s'intéressant à l'influence de l'angiogenèse sur la réponse T CD4 anti-tumorale systémique, nous avons décrit un rôle suppresseur du facteur pro-angiogénique angiopoiétine-2 (ANGPT2) sur la réponse CD4 Th1 anti-TERT. Ainsi un taux sérique élevé d'ANGPT2 était inversement corrélé à la présence de réponses Th1 anti-TERT chez les patients atteints de CBNPC.

Nous avons montré que le récepteur d'ANGPT2, TIE2 est surexprimé par les MDSC monocytaires (M-MDSC) issus de patients atteints de CBNPC et que le taux d'ANGPT2 était corrélé au pourcentage de MDSC-TIE2+ circulant. Cliniquement, une forte signature ANGPT2/M-MDSC TIE2+ dans le sang était associée à un mauvais pronostic dans le CBNPC. De plus, un environnement ANGPT2/M-MDSC TIE2^{high} favorise l'accumulation de cytokines immunosuppressives telles que le VEGFA, PG2E, et TGF-β.

Sur un plan mécanistique, nous avons montré que ANGPT2 inhibe la fonction de clones Th1 anti-TERT en potentialisant les fonctions suppressives des M-MDSC-TIE2+.

En conclusion, ce travail a également permis de décrire l'histoire naturelle de la réponse Th1 anti-TERT périphérique dans le cancer bronchique et de montrer son rôle opposé à des mécanismes d'échappement comme l'épuisement lymphocytaire et l'angiogénèse.

Les résultats de ce travail soulignent l'intérêt de l'analyse des réponses Th1 anti-TERT dans le sang périphérique chez des patients atteints de cancers et ouvrent des perspectives pour son utilisation comme biomarqueur de l'immunité adaptative anti-tumorale chez les patients atteints de cancer et pour évaluer l'efficacité des immunothérapies.

Title : Study of circulating CD4 Th1 response against telomerase in cancer patients : Methods of analysis and interest for monitoring in immuno-oncology

Keywords : CD4 T cell, telomerase, ELISpot, cancer, immunotherapy

Abstract: The concept of cancer immunity cycle supports the presence of pre-existing antitumor T cells in cancer patients that are controlled by multiple activation/inhibitory signals. Although many studies have heavily focused on CD8 T cells responses, evidences also support the critical antitumor role of CD4 T cell immunity in the tumor microenvironment. However, the role of systemic tumor-specific CD4 Th1 responses has not been widely explored.

In this thesis project, we investigated immunological characteristics and clinical relevance of circulating antitumor CD4 Th1 response in a cohort of 170 non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (TeloCap1 study). The antitumor CD4 Th1 response was assessed by IFN-γ ELISPOT assay in blood lymphocytes using a mixture of highly promiscuous HLA class II-restricted epitopes from telomerase (TERT).

The presence of anti-TERT Th1 response was detected in 59/170 patients (35%). We showed that circulating TERT-specific CD4 T cells detected in NSCLC produce IFN-γ, TNF-α, and IL-2, and expressed CXCR3, underlining a Th1 polarization. The frequency of anti-TERT Th1 response gradually decreased from localized to metastatic NSCLC stage, 55% versus 24% respectively. We found that NSCLC patients who exhibited high rates of anti-TERT Th1 cells had better overall survival compared with patients with anti-TERT $Th1^{low}$ in blood (not reached versus 12 months, P = 0.009). Notably, an opposite link was found between anti-TERT Th1 and exhausted T cells co-expressing PD-1^{+} and TIM-3^{+}, so that that the presence of anti-TERT Th1 response in patients was associated with lower rates of exhausted PD-1+/TIM- 3+ T cells in blood.

Based on the levels of anti-TERT Th1 and PD-1+/TIM- 3+ CD4 T cells in blood, we stratified NSCLC patients into three distinct prognostic groups (best, intermediate and poor). The best group represents patients with anti-TERT $Th1^{high}$/ exhausted $CD4^{low}$ supporting a protective antitumor role of systemic anti-TERT Th1 response in NSCLC.

By searching factors likely to influence the circulating anti-TERT Th1 response, we described an immune regulatory role of the proangiogenic factor as angiopoietin-2 (ANGPT2). We found in this cohort of NSCLC that the presence of an ANGPT2 rich environment was strongly associated with an impairment of pre-existing anti-TERT Th1 responses. We demonstrated that TIE2, the receptor for ANGPT2 was overexpressed on subsets of monocytic Myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC) and showed a positive correlation between the level of ANGPT2 and circulating rate of TIE2+M-MDSC.

The presence of an ANGPT2/ TIE2+ M-MDSC rich signature in blood was associated with an impairment of anti-TERT Th1 response. We demonstrated that ANGPT2 sensitizes TIE2+ M-MDSCs cells to suppress antitumor T cells. Consequently, upregulation of the ANGPT2/TIE2+M-MDSC signature in blood was associated with a poor prognosis in NSCLC. Thus, we identify the ANGPT2/TIE2+ M-MDSC axis as a participant in tumor immune evasion.

Collectively, our results reported the natural history of the systemic anti-TERT CD4 Th1 immunity in NSCLC and showed its opposite role against T cell exhaustion and angiogenesis. These results support the interest to use the anti-TERT Th1 response as a new blood-based tool for patients' stratification and for therapy decision.

Université Bourgogne Franche-Comté
32, avenue de l'Observatoire
25000 Besançon

Sommaire

Liste des abréviations 10

Liste des figures 11

Liste des tableaux 13

Introduction 15

Préambule : De l'immunosurveillance à l'immunothérapie 17

I. Biomarqueurs des immunothérapies 20

A. L'épuisement lymphocytaire T : cible de nouvelles immunothérapies 20

1. L'épuisement lymphocytaire T et l'échappement tumoral 20

a. CTLA-4 21

b. PD-1 22

c. TIM-3 24

d. Conséquences de l'épuisement lymphocytaire 26

2. Les inhibiteurs de checkpoints 27

B. Principaux biomarqueurs des inhibiteurs de checkpoints 29

1. Qu'est-ce qu'un biomarqueur ? 29

2. Biomarqueurs associés au microenvironnement tumoral 31

a. Expression de PD-L1 31

b. La charge mutationnelle de la tumeur (TMB) 33

c. Infiltrat immunitaire intratumoral 34

d. Signature Interféron 36

3. Biomarqueurs systémiques 39

a. LDH 39

b. Les taux de lymphocytes, neutrophiles et éosinophiles, et le NLR 40

c. Marqueurs fonctionnels et d'activation des lymphocytes T 40

d. Les cellules myéloïdes suppressives 41

e. Les cytokines 44

f. PD-L1 soluble 44

g. Les exosomes 45

h. ADN tumoral circulant 45

i. Diversité du TCR 46

4. Le microbiote 47

5. Evolution vers un biomarqueur composite 47

II. Outils d'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs dans le sang 50

A. Sang périphérique, carrefour de circulation des cellules immunitaires 50

B. Les antigènes associés aux tumeurs 51

1. Les antigènes cancer/testis 52

2. Les antigènes de différenciation 52
3. Les antigènes surexprimés 53
4. Les antigènes mutés et les néoantigènes 53
5. Les antigènes viraux 54
C. Les techniques de détection des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs dans le sang 55
1. Les multimères p-MHC 56
a. Principe 56
b. Méthode 58
c. Sensibilité 59
d. Points forts 59
e. Limites 60
f. Optimisation 60
2. La détection de cytokines intracellulaires 62
a. Principe 62
b. Méthode 62
c. Sensibilité 63
d. Points forts 64
e. Limites 64
f. Optimisation 65
3. L' ELISpot 66
a. Principe 66
b. Méthode 67
c. Sensibilité 67
d. Points forts 68
e. Limites 69
f. Optimisation 69
4. Analyse comparative des techniques 71
5. Amplification *in vitro* des lymphocytes T spécifiques 72
a. Méthode classique d'IVS 73
b. Utilisation de cellules présentatrices d'antigènes 74
c. Utilisation de molécules de costimulation 74
D. Valeur pronostique des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs 75
III. Rôles des lymphocytes T CD4 dans l'immunité anti-tumorale 80
A. Lymphocytes T CD4 Th1 : un rôle anti-tumoral majeur 81
B. Lymphocytes Th2 85
C. Lymphocytes Th17 86
D. Lymphocytes Th9 87
E. Lymphocytes T helper follicullaire 88
F. Lymphocytes T CD4 régulateurs 88

IV.La télomérase 91

A. La télomérase : enzyme responsable de l'immortalisation des cellules cancéreuses 91

B. Rôle de la télomérase dans l'oncogénèse 92

C. La télomérase : un antigène surexprimé dans la majorité des cancers 94

Rationnel et Objectifs 97

Résultats 103

Article 1 : Distinct prognostic value of circulating anti-telomerase CD4+ Th1 immunity and exhausted PD-1+/TIM-3+ T cells in lung cancer 105

Article 2 : Immunoregulatory role and clinical significance of ANGPT2/TIE2^{+} M-MDSC signature in Non-Small Cell Lung Cancer 113

Discussion – Perspectives 125

1. Phénotype, polarisation de la réponse CD4 Th1 anti-TERT périphérique 127
2. Paramètres influençant la réponse CD4 Th1 anti-TERT 128
3. La télomérase comme un antigène de tumeur relevant pour le suivi des réponses T anti-tumorales 140
4. Place de l'ELISpot comme outil de monitoring des lymphocytes T spécifiques 144
5. Relevance clinique de la réponse CD4 Th1 anti-TERT périphérique 148
6. Modulation des réponses CD4 Th1 anti-TERT par les traitements anticancéreux 152
   a. Influence des traitements cytotoxiques sur la réponse T 152
   b. Utilisation comme biomarqueur des immunothérapies 154

Conclusion 159

Bibliographie 161

Annexes 205

Annexe 1 : Liste non exhaustive d'études de monitoring des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs détectées dans le sang de patients atteints de cancer

Annexe 2 : Liste des essais cliniques

Annexe 3 : Article " Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4+ Th1 responses against telomerase in cancer patients" ,Laheurte et al., 2016

Annexe 4: Article "Circulating NKp46+ Natural Killer cells has a potential regulatory property and predicts distinct survival in Non-Small Cell Lung Cancer", Picard et al, 2018

Annexe 5: Article "Metronomic cyclophosphamide induces regulatory T cells depletion and PSA-specific T cells reactivation in patients with biochemical recurrent prostate cancer", Laheurte et al, 2019

Liste des abréviations

A

ALK : Anaplastic lymphoma kinase
AMP : Adénosine mono phosphate
ANGPT2 : Angiopoietine-2
ARG1: Arginase A
ATP : Adénosine tri phosphate

B

BCL-XL:B-cell lymphoma-extra large

C

CEA : Carcinoembryonic antigen
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
COX2 : Cyclooxygenase 2
CSF-1: Colony-stimulating factor 1 receptor
ctDNA : circulating tumor DNA
CTL : Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CXCR :C-X-C motif chemokine receptor

D

DC : Dendritic cell

E

EGFR: Epidermal Growth Factor receptor
eMDSC: Early MDSC
EMT:Epithelial–mesenchymal transition

F

FDA: Food and drug administration
Foxp3: Forkhead box P3
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGL1 : Fibrinogen-like protein 1

G

Gal-9 : Galectine-9
G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GITR: Glucocorticoid-induced TNFR family related gene
GM-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor
GMP: Granulocyte-macrophage progenitors

H

HIF: Hypoxia inducible factor
HLA: Human leukocyte antigen
HMGB1: High–mobility group box1
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

I

ICB: Immune checkpoint blockade
ICOS : Inducible T cell co-stimulatory
IDO: Indolamine-2,3-Dioxygenase
IFN: Interféron
ILC : Innate Lymphoid Cell
IVS : In vitro stimulation

J

JAK : Janus kinase

K

KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

L

LAG-3:Lymphocyte-activation protein 3
LB : Lymphocyte B
LDH : Lactate deshydrogénase
LOX-1: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1
LPS: Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
LXR : Liver X receptor

M

Mb : Mégabase
M-CSF:Monocyte colony-stimulating factor
MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells
MET: microenvironnement tumoral
M-MDSC: MDSC monocytaires
MMP9: Matrix metallopeptidase 9
mTOR: Mammalian target of rapamycin

N

NADPH:Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κb: Nuclear factor-kappa B
NK/NKT : Natural Killer/T cell
NLR : Neutophyle to lymphocyte ratio
NO: Monoxide d'azote
NOS: Nitric oxide synthase
NSCLC: Cancer bronchique non à petites cellules

O

OS: Overall survival

P

PAP : Prostatic acid phosphatase
PBMC: Peripheral blood mononuclear cells
PD-1: Programmed death-1
PD-L1: Programmed death ligand -1
PFS: Progression free survival
PGE_2: Prostaglandine E2
PMN: Polymorphonuclear
PP2A : protein phophatase 2A
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PSA : Prostate-specific Antigen

R

RAGE : Receptor for advanced glycation end products

ROS: Reactive oxygen species

S

SHP-2 : Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2
STAT: Signal transducer and activator of transcription
STING: Stimulator of interferon genes

T

TAA : Tumor associated antigen
TAM: Tumor associated macrophage
TCF1 : T cell factor 1
TCR: T cell receptor
TEM: TIE2-expressing monocyte/macrophage
TERT: Telomerase Reverse Transcriptase
TGF-β: Transforming growth factor
Th: T helper
THF : T helper folliculaire
TIE2: Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
TIGIT: T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIL: Tumor associated lymphocyte
TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR : Toll-like receptor
TMB : Tumor mutational burden
TME : Tumor microenvironment
TNF : Tumor necrosis factor
TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand
TREG: Lymphocyte T régulateur

V

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Liste des figures

Figure 1 : Théorie de l'immunoédition des cancers et principe de l'immunothérapie

Figure 2 : Principaux récepteurs inhibiteurs associés à l'épuisement lymphocytaire T

Figure 3 : Mécanisme d'inhibition de CTLA-4.

Figure 4 : Mécanisme d'inhibition de PD-1

Figure 5 : Mécanisme d'inhibition de TIM-3.

Figure 6 : Phases de différentiation d'un LT conduisant à un état d'épuisement lymphocytaire terminal.

Figure 7 : Indications actuelles des immunothérapies anti-CTLA4, anti-PD-1 et anti-PD-L1 avec le taux de réponses objectives à ces traitements

Figure 8 : Biomarqueurs potentiels prédictifs de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

Figure 9 : Classification des tumeurs selon l'infiltrat immunitaire pré-existant

Figure 10 : Intérêt de la combinaison des biomarqueurs statiques et dynamiques dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancers : scénarios de réponses

Figure 11 : Le cancer immunogramme

Figure 12 : Le cycle de la réponse T anti-tumorale

Figure 13 : Méthodes utilisées pour l'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeur chez des patients atteints de cancers

Figure 14 : Schématisation de la fabrication d'un tétramère de classe I et de classe II.

Figure 15 : Schématisation de la technique de multimère pMHC

Figure 16 : Schématisation de la technique ICS

Figure 17 : Schématisation de la technique d'ELISpot

Figure 18 : Fréquence de détection des réponses T spécifiques dans le répertoire T humain détectées par méthode directe

Figure 19 : Les différentes sous populations de LT CD4 helper.

Figure 20 : Rôle helper des CD4 Th1 sur les CTL

Figure 21 : Rôle anti-tumoral des CD4 Th1.

Figure 22 : Association entre la présence de LTh1 intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers

Figure 23 : Association entre la présence de LTh2 intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers.

Figure 24 : Association entre la présence de LTh17 intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers

Figure 25 : Association entre la présence de LTh9 intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers

Figure 26 : Rôle suppressif des LT régulateurs

Figure 27 : Association entre la présence de LTregs intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers

Figure 28 : Structure de la télomerase et horloge télomérique

Figure 29 : Fonctions de la télomérase

Figure 30 : Fréquence des mutations du promoteur de TERT dans différents cancers

Figure 31 : Association entre le taux de M-MDSC et la réponse CD4 Th1 anti-TERT dans différents cancers

Figure 32 : Taux de cytokines inflammatoires et inhibitrices mesurées dans le sérum des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules

Figure 33 : Association entre la réponse T anti-tumorale et le taux sérique de cytokines pro-angiogéniques ANGPT2 et VEGFA mesurées chez des patients atteints de cancer du poumon.

Figure 34 : Modèle de suppression des réponses T anti-tumorales médié par l'axe ANGPT2 / M-MDSC TIE2+.

Figure 35: Classification proposée pour un monitoring de l'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs

Figure 36 : Polarisation des réponses T spécifiques de TERT restreinte HLA-DP4

Figure 37 : Réponses T CD4 Th1 anti-TERT et anti-virale détectées par méthode ELISpot IFN-γ après IVS 6 jours versus 48h

Figure 38 : Association entre la présence de la réponse CD4 Th1 naturelle spécifique de TERT mesurée avant traitement et la survie des patients atteints de cancer du côlon et mélanome

Figure 39 : Réponses CD4 Th1 anti-TERT chez des patients long survivants après chirurgie d'un cancer colorectal versus des patients métastatiques d'un cancer colorectal

Figure 40 : Modulation des réponses CD4 Th1 anti-TERT après 3 mois de traitement de chimiothérapies chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules

Figure 41 : Association entre l'évolution de la réponse T anti-TERT circulante et la survie des patients atteints de cancer du poumon et mélanome traités par anti-PD-1

Liste des tableaux

Table 1 : Seuil de positivité de l'expression de PD-L1 par IHC pour le traitement par anti-PD-1/PD-L1 dans le cancer du poumon.

Table 2 : Biomarqueurs potentiels prédictifs de réponses aux inhibiteurs de checkpoints identifiés au sein du microenvironnement tumoral.

Table 3 : Marqueurs phénotypiques minimaux d'identification des MDSC

Table 4 : Association entre plusieurs phénotypes de MDSC et le pronostique des patients atteints de cancer

Table 5 : Biomarqueurs potentiels prédictifs de réponses aux inhibiteurs de checkpoints identifiés au sein du compartiment sanguin

Table 6 : Les cinq grandes familles d'antigènes de tumeurs

Table 7 : Caractéristiques des trois techniques majoritairement utilisées pour la détection des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs.

Table 8 : Liste des études associant la réponse T spécifiques d'antigènes de tumeurs mesurée dans le sang et les données cliniques de patients atteints de cancers

Table 9 : Séquences des 8 peptides TERT retreints HLA-DR et HLA-DP4 identifiés dans le laboratoire

Table 10 : Synthèse des fréquences des réponses CD4 Th1 anti-TERT et de leur association avec les données de survie de patients atteints de différents cancers.

Introduction

Préambule

De l'immunosurveillance à l'immunothérapie

La capacité du système immunitaire à reconnaitre et à lutter contre les cellules tumorales est une hypothèse émise dès le début du vingtième siècle par Ehrlich et formalisée sous le terme d'immunosurveillance par M.F. Burnet et L. Thomas au cours des années 1960. Le concept d'immunosurveillance a ensuite été appuyé par des expériences de rejet tumoral réalisées par W.B. Foley en 1953. Puis de nombreuses études ont suivies validant ainsi ce concept d'immunosurveillance. L'équipe de Robert D. Schreiber a ainsi pu démontrer que des tumeurs induites par un carcinogène, le méthylcholanthrène, dans des souris immunocompétentes, puis réinjectées dans des souris immunodéficientes (RAG2-/-) induisaient dans tous les cas une prise et un développement tumoral, alors que lorsque les tumeurs proviennent de souris immunodéficientes et qu'elles sont greffées à des souris immunocompétentes, ces dernières ne développent une tumeur que dans la moitié des cas (Shankaran et al., 2001). Les tumeurs développées dans des souris immunodéficientes seraient donc plus immunogènes (non éditées) que celles développées dans des souris immunocompétentes (éditées) et le système immunitaire des souris normales est capable de sélectionner les tumeurs en supprimant les cellules tumorales les plus immunogènes. Cette importante découverte met en évidence un double effet de la réponse immunitaire, elle assure la protection de l'hôte mais en contrepartie, elle exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales qui les force à échapper à la surveillance du système immunitaire. C'est la notion de perte d'immunogénicité, qui favorise l'émergence de clones tumoraux moins immunogènes (immunoediting) (Dunn et al., 2002). A la suite de cette étude, la théorie de l'immunosurveillance a été révisée et rebaptisée théorie de « l'immunoediting » (Schreiber et al., 2011). Cette nouvelle théorie précise que les interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales peuvent conduire à trois phases, l'élimination, l'équilibre, et l'échappement, constituant « les 3 E de l'immunoediting du cancer » décrite par le groupe de Schreiber et al (Dunn et al., 2004)(Figure 1).

Lors de l'établissement de la tumorigénèse, les cellules vont émettre des signaux de dangers capables d'alerter et d'activer le système immunitaire. Notamment, les macrophages de type M1 et les granulocytes vont sécréter différentes cytokines inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les cellules tumorales vont exprimer des protéines de surface MICA et MICB, qui vont permettre l'activation des NK. Ces dernières expriment également à leur surface des antigènes du soi modifiés (antigènes tumoraux) qui peuvent être reconnus par les lymphocytes T.

Les cellules effectrices vont également relarguer l'IFN-γ qui va inhibiter la prolifération tumorale et l'angiogenèse. Durant cette première phase, la contribution des acteurs de l'immunité innée et adaptative engendre l'élimination des cellules tumorales et prévient le développement de la tumeur. Dans un second temps, les cellules du système immunitaire de l'hôte et les variants tumoraux qui auront survécu à la phase d'élimination entrent dans une phase d'équilibre (Dunn et al., 2002). La balance entre les cellules immunosuppressives et les cellules capables de fonctions anti-tumorales est à l'équilibre (Mittal et al., 2014). La prolifération et les mutations continuent mais le phénomène de l'immuno-édition se met en place dans le but d'atténuer l'antigénicité tumorale, les lymphocytes et l'IFN-γ exercent une pression capable de contenir le développement de la tumeur (Dunn et al., 2002). Cependant, si la phase d'élimination ne permet pas l'éradication complète des cellules transformées, la pression de sélection exercée par l'immunité adaptative lors de la phase d'équilibre va permettre peu à peu l'émergence de clones tumoraux ayant les capacités de s'évader de la surveillance du système immunitaire, c'est la phase d'échappement. Cette dernière phase est le résultat d'un épuisement de la réponse immunitaire, la masse tumorale devient incontrôlable, les cellules cancéreuses ont développé différents mécanismes de tolérance ou de suppression immunitaire, leur permettant d'échapper au système immunitaire. Cette dernière étape est reconnue comme l'une des « hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2011).

Ainsi, le développement du cancer résulte d'une immunosurveillance insuffisante causée par de nombreux mécanismes d'échappement. Parmi eux, ceux qui sont liés au phénomène d'immunoediting, telle que par exemple la perte des molécules impliquées dans la présentation de l'antigène, ou la résistance à la lyse tumorale. D'autres mécanismes vont concerner le microenvironnement tumoral (TME), via le recrutement de cellules immunosuppressives (Tregs, macrophages de type M2, cellules myéloïdes suppressives,) ou à la production de cytokines inhibitrices (IL-10, TGF-β, …) et enfin, l'état non fonctionnel des lymphocytes T intra-tumoraux dû notamment à l'accumulation de molécules co-inhibitrices à leurs surfaces. En effet, ces acteurs moléculaires clés de l'immunité, CTLA-4 et PD-1, découverts dans les années 1980 et 1990, sur la base de leur nature inductible lors de l'activation cellulaire T ont été à l'initiation de travaux de recherche majeurs (Brunet et al., 1987; Ishida et al., 1992; Leach et al., 1996). En effet, la découverte que l'inhibition de la régulation immunitaire négative des cellules T pourrait être exploitée comme une puissante stratégie anti-cancer, fut un tournant dans le domaine de l'immunologie tumorale, scellée par la remise du prix Nobel de médecine à Mrs Allison et Honjo en 2018.

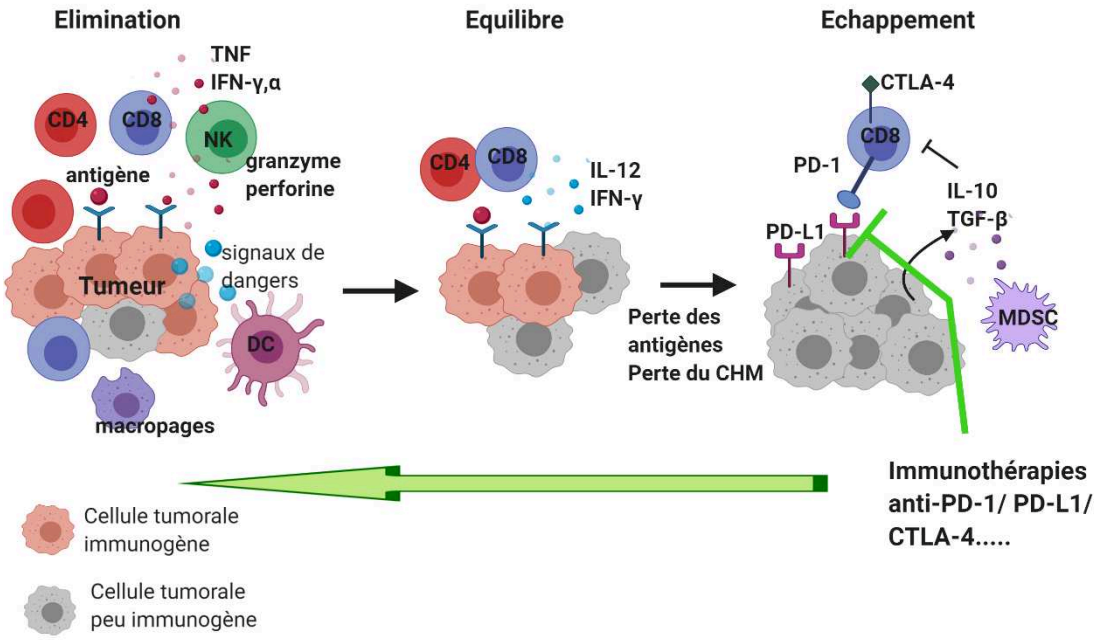


Figure 1 : Théorie de l'immuno-édition des cancers et principe de l'immunothérapie. L'immunoédition se compose de trois phases : l'élimination des cellules tumorales immunogènes par le système immunitaire inné et adaptatif, l'équilibre qui constitue une balance entre la destruction des clones immunogènes et la sélection de ceux qui le sont moins, et l'échappement, les clones non immunogènes ne sont plus reconnus par le système immunitaire devenu lui-même permissif. L'environnement est immunosuppressif et les cellules T spécifiques vont exprimer de nombreux récepteurs inhibiteurs (PD-1, TIM-3…). L'immunothérapie intervient dans cette phase dans le but de réinstaurer un contrôle anti-tumoral efficace. Adapté de (Schreiber et al, 2011).

L'immunothérapie a complétement bouleversé le paysage des thérapeutiques anti-cancer devenant le traitement de référence de certains cancers. Malgré cette avancée spectaculaire, les traitements par inhibiteurs de « checkpoints » ne marchent pas chez tous les patients et présentent certaines toxicités non négligeables. L'optimisation de l'efficacité de ces immunothérapies se tourne donc vers les combinaisons thérapeutiques et vers l'identification de biomarqueurs permettant de cibler les populations à même de répondre au traitement. Nous savons maintenant que les patients qui répondent au traitement sont ceux qui ont une réponse immune préexistante, cependant à l'heure actuelle, nous ne savons pas mesurer le statut immunitaire d'un patient en routine hospitalière.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la nature, la régulation et la relevance clinique des réponses T CD4 spécifiques d'antigènes de tumeurs notamment spécifique de l'antigène tumoral, la télomérase, dans le sang de patients atteints de cancers.

L'introduction présente 4 grandes parties : les biomarqueurs des immunothérapies ciblant les checkpoints, comment mesurer les réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs, les lymphocytes T CD4 acteurs centraux dans l'orchestration de la réponse T anti-tumorale, et la télomérase, comme antigène de tumeur.

I. Biomarqueurs des immunothérapies

A. L'épuisement lymphocytaire T : cible de nouvelles immunothérapies

1. L'épuisement lymphocytaire T et l'échappement tumoral

L'épuisement lymphocytaire appelé aussi « exhaustion » est un état qui caractérise les lymphocytes T (LT) suite à une stimulation chronique de l'antigène. C'est un état de différenciation définit par plusieurs caractéristiques telles que la perte progressive des fonctions effectrices, la co-expression de multiples récepteurs inhibiteurs, l'expression et l'utilisation altérée des facteurs de transcription, qui distingue les lymphocytes T épuisées des LT effecteurs ou mémoires (Wherry, 2011; Wherry and Kurachi, 2015). Parmi ces caractéristiques, la surexpression des récepteurs inhibiteurs représente un signal majeur de l'exhaustion (Thommen and Schumacher, 2018). Bien que les récepteurs de points de contrôle immunitaire ou communément appelés « checkpoints » soient transitoirement exprimés sur les cellules T effectrices durant l'activation, leur expression élevée et soutenue entraine des LT non fonctionnels ou anergiques (Ahmadzadeh et al., 2009; Baitsch et al., 2011). Une dizaine de voie d'inhibition a été décrite, les plus connues sont CTLA-4/b7, PD-1/PD-L1, TIM-3, LAG-3, et TIGIT (Figure 2). Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux voies CTLA-4/b7, PD-1/PD-L1, ciblées par les immunothérapies actuelles et sur TIM-3.

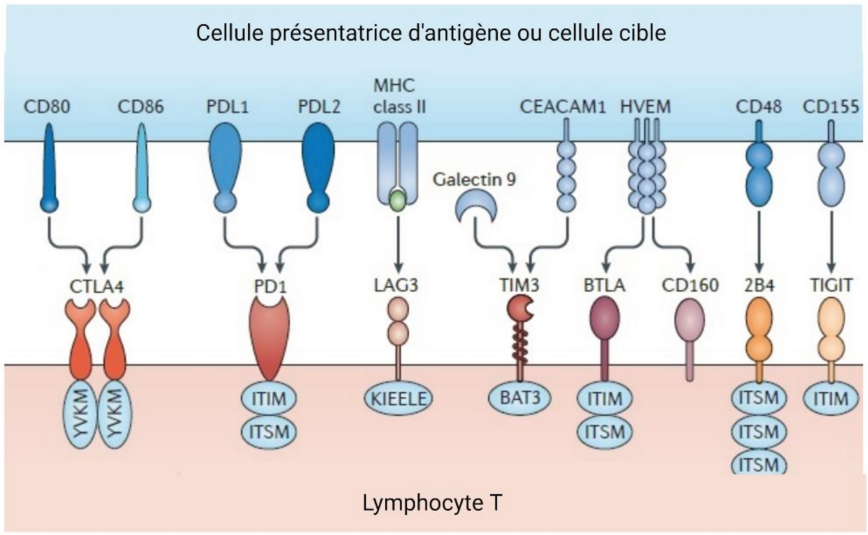


Figure 2 : Principaux récepteurs inhibiteurs associés à l'épuisement lymphocytaire T. En cas de stimulation prolongée par l'antigène, le LT va exprimer les récepteurs inhibiteurs qui vont pouvoir interagir avec leurs ligands respectifs situés sur les cellules cibles (APC, cellule tumorales ou tissus/macrophages), Adapté de (Wherry and Kurachi, 2015).

a. CTLA-4

CTLA-4 est le premier checkpoint cliniquement ciblé par les immunothérapies. Il est stocké constitutivement dans des compartiments intracellulaires du LT au repos et est rapidement transloqué à la surface de la membrane cellulaire afin d'être fonctionnel au niveau de la synapse immunologique. L'intensité du recrutement de ce récepteur à la synapse immunologique est corrélée positivement à l'intensité du signal activateur délivré par le TCR (Wei et al., 2018).

CTLA-4 présente une homologie structurelle très élevée avec la molécule CD28 pouvant ainsi se lier à ses ligands B7, CD80 et CD86. Comme le CTLA-4 a une plus forte affinité pour ses ligands que le CD28, il entre en compétition avec lui et agit en tant qu'antagoniste de la costimulation CD28 activatrice des lymphocytes T (Krummel and Allison, 1995). L'engagement de CTLA-4 va moduler négativement la signalisation du TCR en recrutant la PI3K et les phosphatases SHP-2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2) et PP2A (protein phophatase 2A), limitant ainsi la formation des complexes Zap-70. Cette signalisation entraine une inhibition de la production d'IL-2, se traduisant par une anergie des LT. Cette compétition atténue également les signaux costimulateurs délivrés par CD28 au sein des organes lymphoïdes secondaires et dans les tissus périphériques. La signalisation CTLA4 constitue donc une très forte voie de rétrocontrôle négatif de la réponse immune (Figure 3).

L'engagement de CTLA-4 peut avoir lieu aussi bien au sein des LT CD8 que T CD4, néanmoins, il semble que CTLA-4 influence plus majoritairement la biologie des cellules T CD4+ en induisant notamment les capacités immunosuppressives et la prolifération des lymphocytes T régulateurs. En effet, CTLA-4 est également exprimé de façon constitutive par les Tregs, indispensable à ses fonctions immunosuppressives. Ainsi, il réduit le niveau des ligands B7 sur les cellules présentant l'antigène aux effecteurs, inhibant davantage l'immunité des cellules T effectrices (Park et al., 2018; Topalian et al., 2015). De plus, l'équipe de Qureshi a montré que les cellules exprimant CTLA-4 trans-endocytosait CD80 et CD86 exprimés sur les cellules voisines, empêchant ainsi la co-stimulation CD28 (Qureshi et al., 2011).

CTLA-4 existe également sous une forme sécrétée qui pourrait également interagir avec B7, mais les mécanismes autour de cette forme soluble ne sont pas encore totalement élucidés.

En raison de son rôle central dans la régulation de l'activation des LT, CTLA-4 est nécessaire dans le maintien de la tolérance. En témoigne sa suppression génétique conduisant à une lymphoprolifération massive létale.

Une corrélation négative entre les niveaux d'ARNm ou de protéine CTLA-4 et les résultats cliniques ont été observés dans les tumeurs leucémiques et solides (Schnell et al., 2020). Dans le cancer du poumon, l'expression dans les tumeurs primaires prédit une amélioration

de la survie des patients, tandis que son expression dans le ganglion lymphatique sentinelle est en corrélation avec un mauvais résultat clinique (Paulsen et al., 2017).

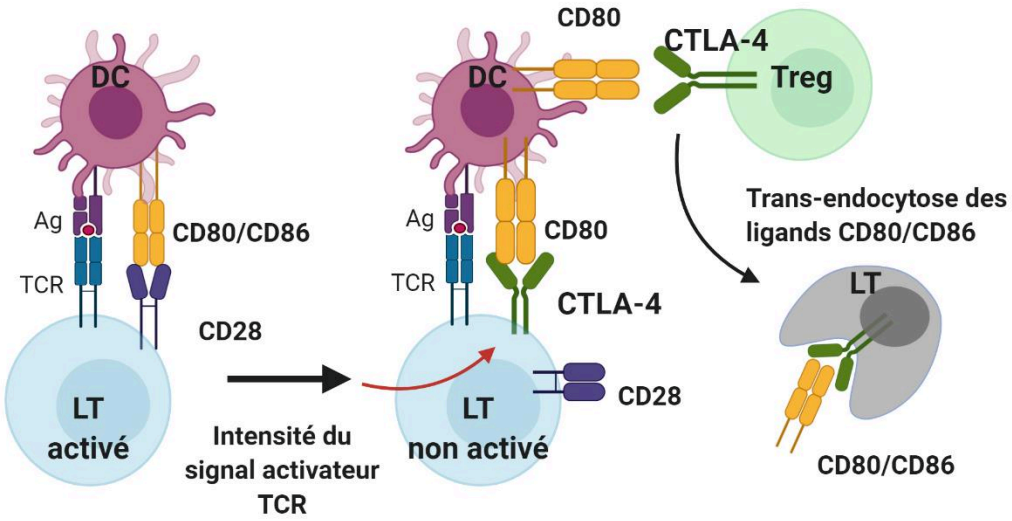


Figure 3 : Mécanisme d'inhibition de CTLA-4. Après stimulation antigénique, CTLA-4 se lie aux ligands B7 avec une affinité de liaison plus élevée que CD28, permettant de diminuer l'activation des LT. CTLA-4 est exprimé constitutivement par les Tregs et contribue à raréfier la disponibilité des molécules B7. Egalement, CTLA-4 est capable de trans-endocytose, permettant la capture des molécules CD80/CD86 avoisinantes.

b. <u>PD-1</u>

PD-1 est un régulateur négatif dominant de la fonction effectrice lymphocytaire T. En condition physiologique, ce mécanisme est essentiel au maintien de l'homéostasie immunitaire ; une invalidation du gène de Pdcd1 codant pour PD-1 chez la souris, a montré la survenue de pathologies auto-immunes (lupus, cardiomyopathie auto-immune) (Nishimura et al., 1999, 2001).

Le récepteur PD-1 est exprimé sur les lymphocytes T activés mais également sur les NK et les lymphocytes B (Fanoni et al., 2011; Terme et al., 2011). Il possède deux ligands, le PD-L1 (ou B7-H1 ou CD274) et le PD-L2. Le PD-L1 est exprimé sur une grande variété de type cellulaire incluant les cellules tumorales, les cellules immunitaires, endothéliales, et épithéliales (Sharma and Allison, 2015). PD-L2 est majoritairement exprimé sur les cellules dendritiques (DC). Lorsqu'il est engagé par son ligand, grâce à l'activité des phosphatase SHP-1 et 2, PD-1 inhibe les voies de signalisation de la kinase qui conduisent normalement à l'activation des lymphocytes T. Ainsi, PD-1 régule directement le signalement du TCR pour diminuer l'activation du LT. Contrairement à la voie CTLA-4/B7, PD-1 inhibe principalement l'activité des lymphocytes T effecteurs dans la phase effectrice des tissus et des tumeurs.

De plus, PD-1 peut également être exprimé par les Tregs et accroitre l'environnement immunosuppressif (Francisco et al., 2010), et sur les macrophages associés aux tumeurs, il est à l'origine d'un défaut de phagocytose des cellules tumorales (Gordon et al., 2017) (Figure

4). Le mécanisme de signalisation impliqué dans l'activation de PD-1 n'est pas encore totalement élucidé, néanmoins des équipes ont identifié le costimulateur CD28 comme une cible de l'inhibition médiée par PD-1 (Hui et al., 2017; Kamphorst et al., 2017).

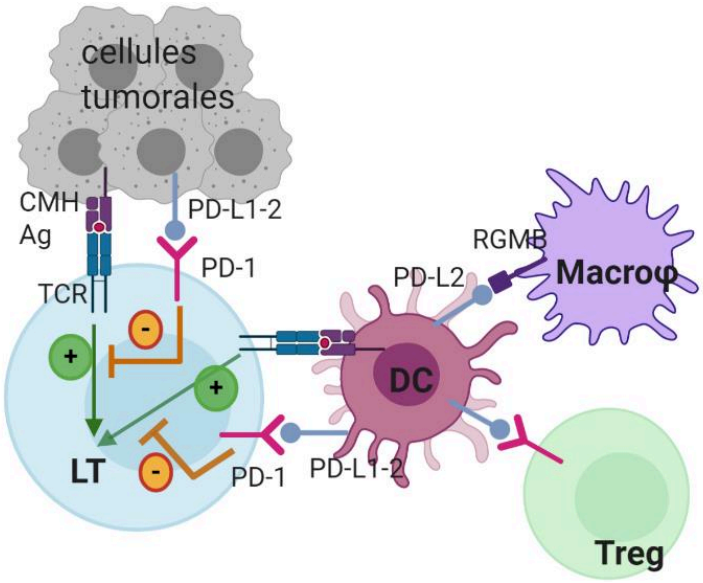


Figure 4 : Mécanisme d'inhibition de PD-1. En réponse à l'activation cellulaire, PD-1 est exprimé par le LT puis va interagir avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 exprimés par les cellules tumorales et les DC provoquant une chute de l'activation. Les Tregs exprimant PD-1 et les macrophages exprimant RGMB (repulsive guidance molecule B) contribuent également à la diminution de l'activation cellulaire.

Du fait de l'exposition chronique des lymphocytes T aux antigènes de tumeurs, PD-1 est exprimé par une grande proportion de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) dans différents cancers. Le ligand de PD-1, PD-L1 est surexprimé à la surface des cellules tumorales dans de nombreuses tumeurs solides (Pardoll, 2012). Deux mécanismes sont impliqués dans la régulation de PD-L1 sur les tumeurs. Une expression constitutive (intrinsèque) engendrée par des voies de signalisations aberrantes ou des altérations chromosomiques, non liée à la présence de TILs. C'est par exemple le cas pour le glioblastome, avec une altération de PTEN (Tran et al., 2014). Le second mécanisme a été initialement décrit dans le mélanome, il est extrinsèque, de résistance immunitaire adaptatif induit par l'IFN-γ sécrété par les TILs. Dans ce cas, l'expression de PD-L1 fait suite à l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ce paradoxe s'explique par un mécanisme dans lequel les lymphocytes T cytotoxiques infiltrant la tumeur régulent positivement l'expression de PD-1 et sécrètent l'IFN-γ lorsqu'ils rencontrent des antigènes tumoraux, l'engagement consécutif de PD-1 sur les LT par PD-L1 induit l'inhibition des T et promeut la tolérance immunitaire (Topalian et al., 2016). Ces deux mécanismes peuvent coexister au sein de la même tumeur (Lyford-Pike et al., 2013; Skoulidis et al., 2015).

L'expression de PD-L1 a été observée dans plusieurs tumeurs solides dont les cancers du sein, poumon, estomac, colon, foie, rein, testicules, thyroïde et sa surexpression est généralement associée à un mauvais pronostique (Qin et al., 2015; Ameratunga et al., 2016; Wu et al., 2006; Rosenbaum et al., 2016; Kan and Dong, 2015; Shin et al., 2016; Chowdhury et al., 2016; Cierna et al., 2016). Plusieurs méta-analyses ont confirmé cette association négative avec le pronostique des patients (Wang et al., 2015; Wu et al., 2015). Néanmoins, dans certaines études, il a été rapporté que des taux élevés de PD-L1 correspondaient à un pronostique favorable chez des patients atteints de cancers du poumon (Cooper et al., 2015; Ishii et al., 2015), estomac (Böger et al., 2016), pancréas (Wang et al., 2018) et amygdales (Hong et al., 2016).

De manière générale, un nombre élevé de TILs $CD8^+PD\text{-}1^+$ est associé à un mauvais pronostique des patients dans plusieurs cancers incluant le rein (Giraldo et al., 2015; Thompson et al., 2007), le foie (Garnelo et al., 2017),le pancréas (Shen et al., 2017), tête et cou (Kansy et al., 2017), l'estomac (Jin et al., 2017).

Dans le sang périphérique de patients, bien que beaucoup moins étudié que dans le TME, PD-1 est retrouvé en quantité plus importante sur les LT de patients atteints de cancers par rapport à des donneurs sains (Malaspina et al., 2011; Shimauchi et al., 2007). Une équipe a montré qu'un taux élevé de PD-1 sur les LT CD4 était associé à une meilleure survie comparé à un taux faible, alors qu'une association significative avec la survie n'a pas été retrouvée avec les LT CD8 exprimant PD-1 (Waki et al., 2014). L'expression de PD-1 a été regardée sur les LT spécifiques de Melan-A dans le sang périphérique de patients atteints de mélanome, cette expression est augmentée aux stades métastatiques mais n'est pas associée à la survie des patients.

Ce qui est dorénavant démontré, c'est l'impact de la co-expression des checkpoints sur la survie des patients. En effet, il a été montré que des patients qui présentaient une co-expression de PD-1, LAG-3 et TIM-3 par les LT CD8 caractérisaient un groupe de patients présentant un risque élevé de récidive (Giraldo et al., 2015). Plus récemment chez des patients atteints de cancer du foie lié au virus de l'hépatite B, la co-expression de PD-1 et de TIGIT sur les LT CD8 circulants est associée à la progression de la maladie et au sombre pronostique des patients (Liu et al., 2019).

c. <u>TIM-3</u>

En 2002, TIM-3 (T cell Immunoglobulin mucin domain-3) a été caractérisée comme une protéine membranaire sélectivement exprimée par les lymphocytes producteurs d'IFN-γ (CD4 Th1, CD8) (Monney et al., 2002). On sait maintenant que TIM-3 peut être exprimé par d'autres types cellulaires de l'immunité adaptative tels que les Tregs, les B, et aussi par les cellules de l'immunité innée (NK, DC, monocytes). Le premier ligand de TIM-3 à être identifié est la

galectine-9 (gal-9), qui est une molécule soluble largement exprimée et notamment au niveau des cellules tumorales (Granier et al., 2017). D'autre ligands de TIM-3 ont été identifiés, comme Ceacam-1 (Huang et al., 2015b), HMGB1 (Chiba et al., 2012), la phosphatidyle sérine (DeKruyff et al., 2010) et plus récemment FGL-1 (Wang et al., 2019a; Wolf et al., 2019).

TIM-3 possède un domaine intracytoplasmique constitué de 5 tyrosines. En l'absence de signalement, les résidus tyrosines intracytoplasmiques de TIM-3 interagissent avec une protéine chaperonne Bat-3 qui bloque son activité. Lorsque les ligands Gal-9 et Ceacam-1 se lient à TIM-3, cela induit la phosphorylation des tyrosines libérant Bat-3 et permettant ainsi à une kinase inhibitrice, Fynn, de lier TIM-3 (Huang et al., 2015b). Ainsi, l'engagement de TIM-3 inhibe la signalisation du TCR des lymphocytes T CD8 entrainant une perte des fonctions effectrices (Granier et al., 2018). Au niveau des Tregs, TIM-3 augmente leur activité suppressive (Sakuishi et al., 2013), et sur les cellules dendritiques, en liant HMGB1, il interfère avec la reconnaissance d'ADN par celles-ci (Figure 5). Egalement, différents groupes ont montré que TIM-3 était exprimé sur les lymphocytes T CD8 résidents mémoires, représentant une population active de T effecteurs à activité anti-tumorale (Djenidi et al., 2015; Nizard et al., 2017).

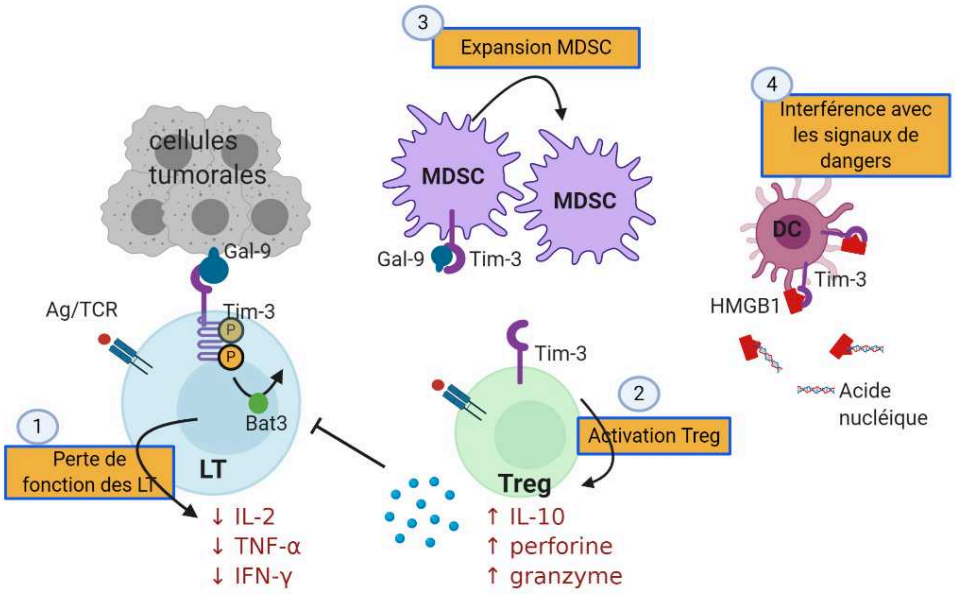


Figure 5 : Mécanisme d'inhibition de TIM-3. TIM-3 exerce son mécanisme tolérogène sur différents types cellulaires. Sur les LT, la liaison à son ligand Gal-9 entraine sa phosphorylation. TIM-3 est également exprimé sur les Tregs, et les MDSC renforçant leurs fonctions immunosuppressives. Il est aussi exprimé par les DC où sa liaison à HMGB1 entraine une interférence avec les signaux de dangers diminuant l'activité de la réponse immunitaire innée. Adapté de (Anderson, 2014).

Les premières fonctions de TIM-3 liées à l'inhibition des réponses T ont d'abord été décrites dans les infections virales chroniques (Jin et al., 2010a) puis dans les cancers, où il est

dorénavant clairement établit que TIM-3 est exprimé sur les lymphocytes T épuisés ou non fonctionnels (Anderson, 2014). Son expression sur les LT est caractéristique d'un fort état d'épuisement, caractérisé par des défauts de prolifération et de production de cytokines effectrices, au-delà de l'expression seule de PD-1 (Wolf et al., 2019). Aussi bien dans des modèles murins que dans des cancers humains, les TILs coexprimant TIM-3 et PD-1 apparaissent fortement non fonctionnels avec des défauts de production d'IFN-γ, TNF-α et IL-2 comparé aux TILs exprimant seulement PD-1 (Sakuishi et al., 2010; Granier et al., 2017).
TIM-3 exprimé seul mais très souvent en co-expression avec PD-1 sur les CD8 intra-tumoraux est associé à un mauvais pronostique dans les cancers du rein (Giraldo et al., 2017; Granier et al., 2017), lymphomes folliculaires (Yang et al., 2012), cancers du foie (Li et al., 2012), cancer du poumon (Thommen et al., 2015; Guo et al., 2018). Dans le cancer du poumon, il a été rapporté que 60% des Tregs infiltrant la tumeur expriment TIM-3 et sont associés à un mauvais pronostique (Gao et al., 2012).
Dans le sang périphérique de patients atteints de mélanome, il a été montré que les lymphocytes T CD8 spécifiques de NYESO-1 détectés exprimaient TIM-3 (Fourcade et al., 2010).

d. <u>Conséquences de l'épuisement lymphocytaire</u>

C'est l'accumulation de plusieurs de ces récepteurs inhibiteurs sur les LT qui va être l'une des causes de l'épuisement lymphocytaire (Koyama et al., 2016). Cet état d'exhaustion va entrainer l'altération ou la diminution des fonctions effectrices, telles que la diminution de la sécrétion des cytokines, la réduction des capacités prolifératives, menant les LT à un état non fonctionnel (Blank et al., 2019). Plusieurs recherches ont été menées ces dernières années dans l'exploration de cet état d'épuisement afin d'en identifier les causes et suggérer de nouvelles opportunités thérapeutiques. On sait maintenant qu'il existe plusieurs degrés d'épuisements fonctionnels, au-delà de la caractérisation des récepteurs inhibiteurs, cet état se caractérise aussi sur la base de l'expression de facteurs de transcription, et récepteurs de chimiokines (Figure 6). Récemment le facteur de transcription TCF1 (T cell Factor 1) a été décrit pour son expression sur les progéniteurs exhausted, en revanche il ne l'est pas sur les cellules T exhausted terminales (Buchholz and Busch, 2019). Le régulateur transcriptionnel TOX, a été nouvellement décrit dans les changement épigénétiques liés à l'épuisement lymphocytaire T (Khan et al., 2019; Scott et al., 2019). Les LT épuisés en différentiation terminale ne seraient plus susceptibles de revenir en arrière par blocage des récepteurs inhibiteurs.

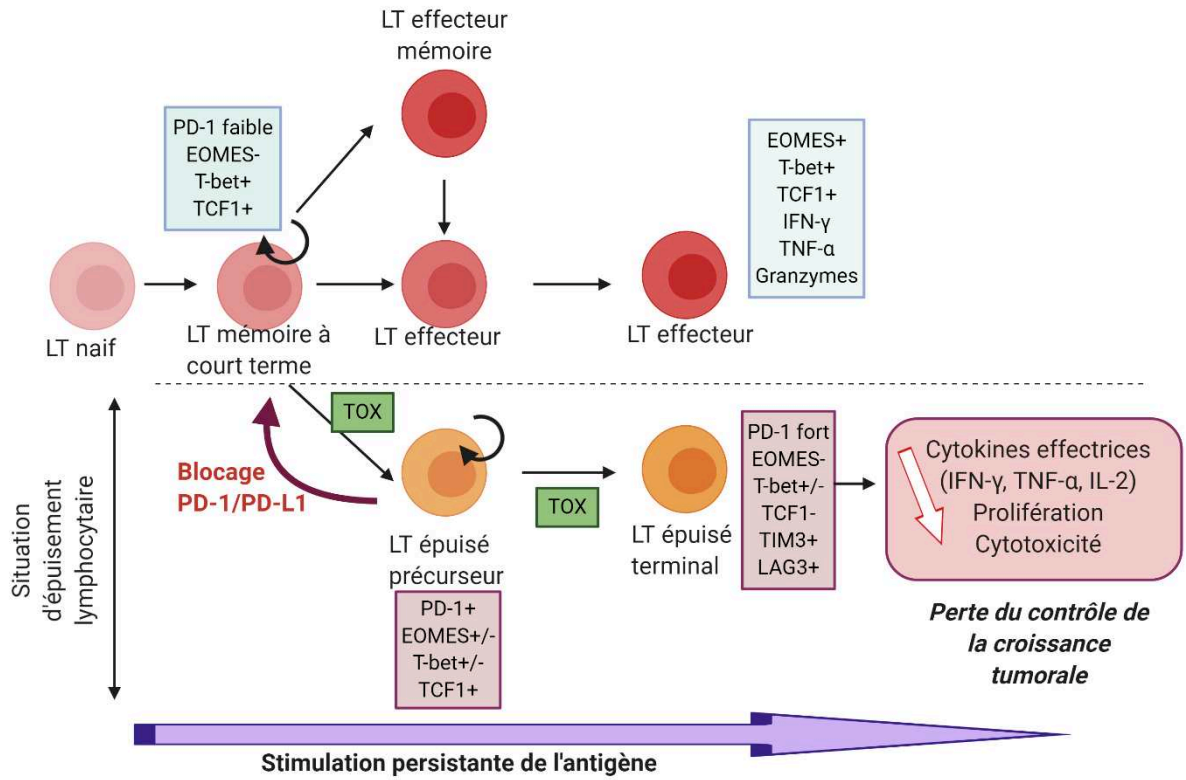


Figure 6 : Phases de différentiation d'un LT conduisant à un état d'épuisement lymphocytaire terminal. Après exposition et activation par un antigène, les lymphocytes T mémoires à court terme prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs, mémoires et en lymphocytes T cytotoxiques. En cas d'exposition prolongée à un antigène, les cellules T effectrices vont s'épuiser progressivement et vont présenter des altérations des facteurs de transcription et vont exprimer plusieurs régulateurs négatifs tels que PD-1. Les lymphocytes T précurseurs expriment modérément T-bet, PD-1, et expriment TCF1 et conservent une capacité de prolifération modérée et un certain potentiel de production de cytokines effectrices. Ces lymphocytes T, toujours soumis à la stimulation antigénique, seraient ensuite emmenées vers un stade de différentiation terminal non réversible par le biais de TOX, Adapté de (Chen and Mellman, 2017; Buchholz and Busch, 2019).

2. Les inhibiteurs de checkpoints

L'anticorps anti-CTLA-4, l'ipilimumab a été le premier inhibiteur de checkpoints approuvé par la FDA en 2011 pour le traitement des cancers avancés. Il a permis de doubler la survie à 10 ans pour le mélanome métastatique (Havel et al., 2019). Les anticorps ciblant le PD-1 ou son ligand le PD-L1 ont suivi peu de temps après. Leur utilisation est associée à des réponses objectives durables chez des patients atteints de cancer, accompagnée par une survie améliorée comparé aux thérapies conventionnelles. Ils sont utilisés en clinique en première ou deuxième ligne d'une liste toujours croissante de différents types de cancers, incluant les mélanomes, lymphomes, cancer du poumon, cancer tête et cou, rein, foie, et cancer de l'œsophage (Hirsch et al., 2019). Le champ d'action des anticorps monoclonaux ciblant les checkpoints s'étend rapidement et devrait continuer à se développer à mesure que de nouveaux agents deviennent disponibles (par exemple anti-LAG3). De surcroit, les

combinaisons thérapeutiques des anticorps ciblant les checkpoints sont actuellement testées dans de nombreux essais cliniques et montrent des résultats intéressants sur le bénéfice clinique des patients (Assi et al., 2018).

Cependant, malgré les résultats spectaculaires de ces immunothérapies chez certains patients, leur taux et durée de réponse reste toutefois variable, un bénéfice clinique n'est observé en moyenne que chez environ 30 % des patients traités. Alors que certains cancers, les plus sensibles répondent aux immunothérapies dans 20 à 50% des cas, d'autres moins sensibles ne répondent au maximum qu'à 15% (Figure 7).

A

Cible	Médicament	Indications homologuées
CTLA-4	Ipilimumab	Mélanome cutané avancé
		Rein
		Colorectal MSI+:dMMR
PD-1	Nivolumab Pembrolizumab Cemiplimab Atezolizumab	Mélanome
		Poumon
		ORL
		Rein
		Hodgkin
		Vessie
		Foie
		Lymphome
		Carcinome de Merkel
		Col de l'utérus
		Cancer de l'estomac
		Cancers épidermoïdes de la peau
		Sein triple négatif
		Cancers MSI+:dMMR
PD-L1	Durvalumab Avelumab	Poumon
		Vessie
		Carcinome de Merkel

B

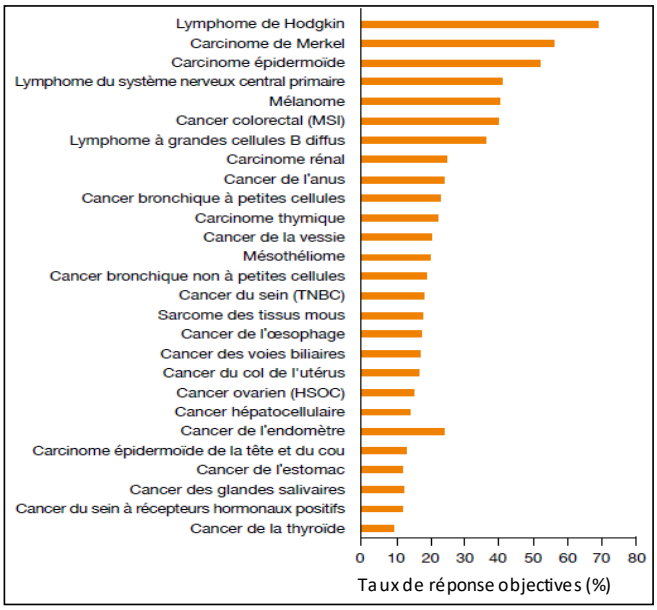


Figure 7 : Indications actuelles des immunothérapies anti-CTLA4, anti-PD-1 et anti-PD-L1 avec le taux de réponses objectives à ces traitements. Adapté de (Hirsch et al., 2019) et du site internet InfoCancer.

Ce taux de réponse objective aux immunothérapies relativement faible s'explique car des résistances aux traitements sont fréquemment observées. Ces résistances peuvent être présentes avant l'initiation du traitement (innées), aucun bénéfice clinique ne sera apporté aux patients, ou elles peuvent apparaitre après une période de réponse clinique (acquises) (Pardoll, 2012; Sharma et al., 2017).

Des résistances sont constatées au niveau de la présence, de l'activation et du recrutement de LT anti-tumoraux. La pression de sélection exercée par le système immunitaire oblige les cellules tumorales à des changements qui vont leur éviter leur élimination (immuno-édition) (Łuksza et al., 2017; McGranahan and Swanton, 2017). Cela peut entraîner la perte des mutations les plus immunogènes et être ainsi à l'origine d'une faible immunogénicité (Schumacher and Schreiber, 2015). Des mutations ou des diminutions dans l'expression des gènes impliqués dans la voie de présentation antigénique peuvent être aussi constatées ainsi

que des délétions spécifiques des molécules HLA de classe I ainsi que la perte de la β2-microglobuline (Ribas and Wolchok, 2018).

D'un autre côté, il peut y avoir également un manque de reconnaissance des antigènes par les cellules T via l'expression de certains gènes oncogéniques, comme la voie Wnt dont l'activation est liée à une exclusion des LT et à des résistances aux anti-PD-1 et CTLA-4 (Spranger et al., 2015).

La voie de signalisation des interférons est également un élément clé des mécanismes de résistance (Pardoll, 2012; Ribas, 2015; Gao et al., 2016; Shin et al., 2016; Zaretsky et al., 2016). L'IFN-γ est produit par les LT spécifiques après reconnaissance de l'antigène et participe à la mise en place de la réponse anti-tumorale mais une exposition continue à l'IFN-γ va être la cause de mutations ou répressions des molécules impliquées dans la signalisation de l'IFN-γ telles que les molécules JAK1 et 2 où des mutations les inactivant sont associées à la non réponse aux anti-PD-1 (Shin et al., 2017; Sucker et al., 2017).

Un autre mécanisme connu de résistance aux immunothérapies est la forte infiltration des tumeurs en MDSC (Meyer et al., 2014; Bellone and Elia, 2017) ainsi que la présence de récepteurs inhibiteurs outre PD-1 et CTLA-4.

Enfin, des facteurs de résistance propres à l'hôte sont également décrits. On sait que certains paramètres tels que l'âge, l'environnement, les polymorphismes génétiques, les modes de vie, le type de HLA ainsi que le microbiome peuvent entrer en jeu (Pitt et al., 2016; Chen and Mellman, 2017; Daste et al., 2017).

La compréhension et l'identification de ces phénomènes de résistance est un point fondamental dans le contexte des immunothérapies qui ne fonctionnent pas chez tous les patients. La problématique des cliniciens se situe donc au niveau de la sélection des patients et sur le choix du meilleur schéma thérapeutique, les méthodes d'évaluation créées pour évaluer la chimiothérapie ne peuvent s'appliquer au mécanisme des thérapies ciblant les inhibiteurs de checkpoints.

Dans cette nouvelle ère de traitement des cancers, appartenant à ce que l'on appelle « la médecine de précision » la recherche d'un biomarqueur constitue donc un enjeu majeur.

B. Principaux biomarqueurs des inhibiteurs de checkpoints

1. Qu'est-ce qu'un biomarqueur ?

Un biomarqueur est défini comme étant une caractéristique mesurable, fiable et reproductible liée à un processus pathologique ou non dont il n'est pas la cause directe (Dancey et al., 2010). Il a plusieurs fonctions, il peut être pronostique, s'il prédit l'issue de la maladie, indépendamment de tout traitement. Plusieurs biomarqueurs pronostiques de la survie ont été

décrits, ils permettent de comprendre certains mécanismes et de faciliter ainsi le développement de thérapies innovantes (par exemple les vaccins). Un biomarqueur peut être prédictif s'il est associé à une probabilité de bénéfice d'un traitement ou d'une toxicité et dans ce cas il va permettre de sélectionner les patients les plus à même de répondre. Par exemple, dans le cadre de la thérapie ciblée des cancers du poumon, sein, mélanome, ovaire, l'existence de biomarqueurs permet de sélectionner le traitement. Ainsi, l'absence de mutation EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique) ou du gène ALK est prédictif d'une non réponse aux traitements par inhibiteurs de tyrosine kinase.
Le biomarqueur permettrait aussi de suivre la réponse du patient pendant le traitement afin de l'orienter, de le combiner ou de l'arrêter. En effet, ni l'arrêt des traitements, ni les combinaisons thérapeutiques en association avec les inhibiteurs de checkpoints ne sont actuellement rationnalisées par un biomarqueur.
Au-delà de la réponse au traitement, des biomarqueurs permettraient aussi d'anticiper la tolérance aux thérapies afin d'en diminuer les toxicités.
Devant ces enjeux majeurs aussi bien en terme d'efficacité des traitements qu'en terme d'enjeux économiques, l'identification de biomarqueurs est aujourd'hui source de nombreuses recherches.

Les recherches de biomarqueurs se font à différents niveaux. Les caractéristiques de l'hôte (génétique, tabac, nutrition, microbiote et autres facteurs environnementaux) font maintenant partie du paysage car on sait qu'elles peuvent affecter les réponses aux immunothérapies. Sur le plan biologique, les biomarqueurs peuvent provenir de la tumeur elle-même (mutation EGFR, KRAS, neoantigènes, …), du microenvironnement tumoral (cellules immunosuppressives, TILs, contexture immunitaire, expression de PD-L1,…) et du compartiment sanguin (LT effecteurs, immunosuppressifs,…) (Figure 8).

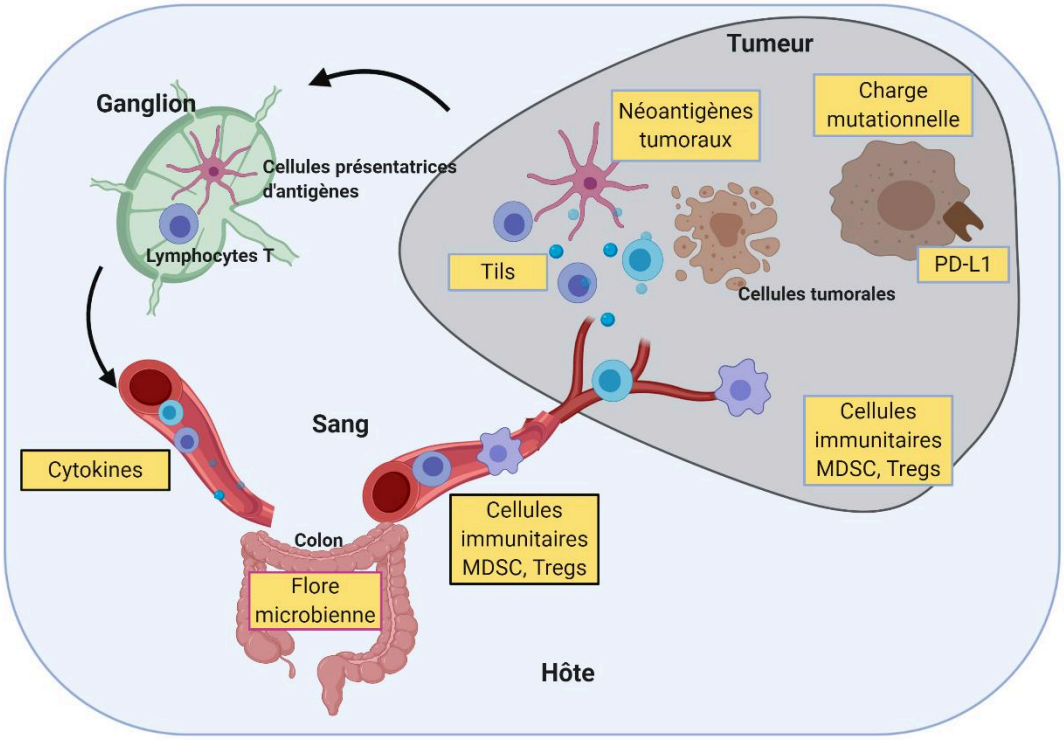


Figure 8 : Biomarqueurs potentiels prédictifs de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Les biomarqueurs potentiels des immunothérapies (encadrés jaunes) peuvent être présents au niveau de la tumeur, du sang périphérique et de l'hôte. Schéma inspiré de (Frelau et al., 2018).

2. Biomarqueurs associés au microenvironnement tumoral

Parmi les acteurs du microenvironnement tumoral (TME) pouvant être modulés par les traitements, et pouvant être des potentiels biomarqueurs, les principaux sont : l'expression de PD-L1, la charge mutationnelle TMB, tous deux validés dans des essais cliniques de phase III et actuellement les seuls biomarqueurs prédictifs d'une immunothérapie anti-PD-1 approuvé par les autorités de santé, les TILs et la signature génique.

a. Expression de PD-L1

PD-L1 est retrouvé surexprimé dans plusieurs types de tumeurs, y compris le mélanome, cancer du poumon non à petites cellules, et carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Son expression peut être homogène dans certains cancers où les tumeurs vont être positives ou négatives (cancer du poumon), mais son expression peut être focale (cancer de l'ovaire). En raison du mécanisme d'action des anti-PD-1/PD-L1, l'expression de PD-L1 sur la cellule tumorale et/ou sur les cellules du TME, a été l'un des premiers biomarqueurs étudiés, principalement par immunohistochimie (IHC). Une méta analyse regroupant plus de 6000 patients montre clairement l'existence d'un bénéfice clinique de l'immunothérapie associé à une expression positive du PD-L1 dans différents types de cancers incluant le cancer de la vessie, du rein, le mélanome, œsophage, tête et cou, Merkel, et cancer bronchiques non à

petites cellules (Mino-Kenudson, 2016). L'évidence d'une association entre une expression élevée de PD-L1 par la tumeur et la réponse clinique aux anti-PD-1/PD-L1, a mené à l'approbation de ce biomarqueur par les autorités de santé en tant que test compagnon des thérapies anti-PD-1/PD-L1 (Gibney et al., 2016; Reck et al., 2016). Par exemple, dans le cancer bronchique, le Pembrolizumab (anti-PD-1) est prescrit en 1ère ligne si l'expression de PD-L1 par IHC est supérieure à 50%. En 2ème ligne, il est prescrit lorsque PD-L1 est supérieur à 1%. En effet, chaque thérapie est associée à son seuil de positivité de PD-L1 par la tumeur (Table 1). Néanmoins, dans d'autres types de cancer, l'expression de PD-L1 n'apparait pas comme étant un marqueur déterminant pour la décision thérapeutique (cancer de l'ovaire).

L'expression de PD-L1 est un biomarqueur important mais son analyse soulève encore quelques difficultés. En plus de l'hétérogénéité d'utilisation de seuil (Table 1), la valeur prédictive de réponse aux immunothérapies de PD-L1 reste imparfaite. Des patients dont leurs tumeurs n'expriment pas PD-L1 peuvent répondre au traitement (Fusi et al., 2015; Teng et al., 2015). Et inversement, des patients potentiellement répondeurs peuvent être exclus.
Plusieurs raisons peuvent en être la cause. Tout d'abord, on peut citer son expression focale pouvant conduire à des faux négatifs, puis une l'homogénéité temporo-spatiale du PD-L1 (Stroncek et al., 2017), causée par une régulation via deux mécanismes différents, énoncés précédemment (I.A.1.b). Tandis qu'une expression constitutive de PD-L1 induite par les voies oncogéniques engendrera plutôt son expression à la surface des tumeurs, et sera plutôt corrélée à un pronostic sombre. Une expression induite par l'INF-γ, en réaction à la réponse immunitaire, implique la présence de PD-L1 sur les cellules tumorales et les cellules immunitaires surtout le long de la marge d'invasion de la tumeur, semble être associée à un meilleur pronostique dans les cancers du poumon, sein, larynx, mélanome (Taube et al., 2012).
D'autres facteurs limitants se situent au niveau méthodologique, généralement la biopsie n'est pas réalisée au moment du traitement, et il existe une hétérogénéité d'un point de vue de la qualité des prélèvements. De plus, PD-L1 représente un marqueur analysé à un temps t, donc statique, qui ne permet pas un monitoring permettant d'ajuster le traitement. Bien qu'il soit admis que sa seule expression n'est certainement pas suffisante dans la sélection des patients, il reste néanmoins un des seul biomarqueur compagnon utilisé à ce jour (Teng et al., 2018).

	Molécules	Indication	Test PD-L1 associé	Approbation AMM	Seuil de positivité
Anti-PD-1	Nivolumab (BMS)	2ème ligne	28-8 Dako	Test complémentaire	Cellules tumorales ≥ 1, 5 10%
Anti-PD-1	Pembrolizumab (MSD)	1ère ligne	22-C3 Dako	Test compagnon	Score de proportion tumorale ≥ 50%
Anti-PD-1	Pembrolizumab (MSD)	2ème ligne	22-C3 Dako	Test compagnon	Score de proportion tumorale ≥ 1%
Anti-PD-L1	Atezolizumab (Roche)	2ème ligne	SP142 Ventana	Test complémentaire	Cellules tumorales ≥ 1, 5, 10%
Anti-PD-L1	Durvalumab (AstraZeneca)	post RTCT stade III	SP263 Ventana	Test compagnon	Cellules tumorales ≥ 1 %

Table 1 : Seuil de positivité de l'expression de PD-L1 par IHC pour le traitement par anti-PD-1/PD-L1 dans le cancer du poumon. Ligne de traitement, clone d'IHC et type de test compagnon ou complémentaire utilisé. Adapté de (Prelaj et al., 2019).

b. La charge mutationnelle de la tumeur (TMB)

La charge mutationnelle de la tumeur ou TMB (Tumor Mutational Burden), est définie comme le nombre de mutations par mégabase (Mb) d'ADN codant. L'évaluation de la charge mutationnelle s'effectue principalement par séquençage haut débit (NGS) de panel de gènes ciblés, ou de séquençage complet de l'exome ou du génome (35 Mb). En pratique, il s'agit d'un ratio établi entre le nombre de gènes tumoraux mutés et le nombre total de gènes étudiés, une charge mutationnelle élevée est définie comme étant supérieure à 10 ou à 20 mutations/ Mb, néanmoins le seuil est variable selon les études (Chan et al., 2019). De plus en plus de preuves attestent du rôle bénéfique de la libération d'antigènes mutés par la tumeur dans la mise en place d'une réponse T anti-tumorale effective, favorable à l'action des immunothérapies. Etant donné qu'il existe une corrélation entre la charge mutationnelle et la charge en néoantigènes, l'intérêt du TMB comme biomarqueur potentiel des immunothérapies s'est positionné (Schumacher and Schreiber, 2015; Van Allen et al., 2015). Plusieurs études ont montré que l'efficacité des immunothérapies était en lien avec des tumeurs solides ayant des taux élevés de TMB (Alexandrov et al., 2013; Yarchoan et al., 2017a; Klempner et al., 2020). C'est notamment vrai pour les tumeurs qui ont une forte charge mutationnelle telle que le cancer du colon de type instabilité microsatellite qui présentent un défaut des protéines de réparation de l'ADN, le cancer du poumon (signature mutationnelle de type tabac) ou encore le mélanome (« lésions UV). Il existe une forte corrélation entre le taux de réponses sous anti-PD-1/PD-L1 et la fréquence des mutations somatiques (Rizvi et al., 2015; Yarchoan et al., 2017b). Néanmoins, on sait aussi que des patients avec une charge mutationnelle élevée peuvent ne pas répondre à l'immunothérapie, (qui peut être due à un défaut de présentation antigénique), ou inversement des patients avec une charge mutationnelle basse et qui répondent à l'immunothérapie (Truesdell et al., 2018). Bien que son utilisation en tant que

biomarqueur soit approuvée par la FDA via deux tests réglementaires Américains : le test FoundationOne, et le MSK-IMPACT, ce biomarqueur reste peu utilisé dans la pratique courante en France. En effet, le TMB reste confronté à certaines difficultés liées premièrement au niveau du nombre de gènes analysés, actuellement étant donné le coût du séquençage d'un exome complet, il s'agit plutôt de quelques Mb qui sont séquencées (0,3 à 1 Mb), or une analyse modélisée plaide plutôt en faveur de l'analyse d'un panel constitué de plus de 300 gènes, soit de plus de 1 Mb afin de garantir une corrélation entre le séquençage complet de l'exome et le panel de gènes ciblés (Garofalo et al., 2016). Le problème se pose d'autant plus lorsque la charge mutationnelle est intermédiaire ou faible. Dans ce contexte, la notion de seuil soulève donc encore des questions ; car un échantillonnage du génome peut être difficilement défini par un seuil établi sur une variable continue telle que le TMB. Un travail d'uniformisation des panels et de définition du seuil doit être réalisé pour identifier de manière fiable la charge mutationnelle des patients.

c. Infiltrat immunitaire intra-tumoral

Une quantité de preuve supporte que la composition et la distribution de l'infiltrat immunitaire a un impact important sur la survie des patients (Fridman et al., 2012, 2017).

Les TILs CD8+

De par leur capacité cytotoxique, le rôle des LT CD8 dans l'élimination du cancer a été très largement étudié dans les modèles expérimentaux et chez l'homme. Les études menées chez la souris indiquent clairement qu'une déficience en lymphocytes T CD8 induisait une plus grande fréquence de tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes (Dunn et al., 2004). Chez l'homme, une forte infiltration en LT CD8 cytotoxiques est associée à un pronostique favorable dans la majorité des cancers humains (Fridman et al., 2017). Les travaux princeps de Coukos et al dans le cancer ovarien a montré que la présence d'un infiltrat tumoral riche en LT CD8 était associé à une meilleure survie globale (Zhang et al., 2003). Les études de Galon et Pagès et al dans le cancer colorectal ont confirmé ces données et ont montré la relevance clinique de sous populations de TIL CD8 de phénotype mémoire CD8+CD45RO+ dans le cancer colorectal. Ces données ont été confirmées dans de larges cohortes internationales de plus de 1000 patients (Pagès et al., 2018). Dans le cancer du poumon non à petite cellules, une méta analyse de plus de 5000 patients montre qu'un infiltrat T riche en CD8 est associé à de meilleures caractéristiques cliniques en terme de survie globale et survie sans progression (Zheng et al., 2016).

Le cancer du rein fait figure d'exception avec le cancer du foie, lymphome folliculaire et lymphome de Hodgkin avec des CD8 intra-tumoraux qui sont associés à un pronostique défavorable (Giraldo et al., 2015; Remark et al., 2013; Che et al., 2014).

Il a aussi été montré que les TILs de type Th1 étaient également associés à une meilleure réponse à la chimiothérapie (Ladoire et al., 2008, 2011a; Mori et al., 2019).

Comme les immunothérapies anti-PD1 et anti-PD-L1 agissent de façon à revigorer la réponse immunitaire anti-tumorale préexistante, la densité de TILs peut être un facteur prédictif de réponses aux immunothérapies (Tumeh et al., 2014; Topalian et al., 2015). Des études ont montré que la présence de TILs CD8+ était associée à la réponse aux anti-PD-1 chez des patients atteints de mélanome, et cancer colorectaux (Le et al., 2015; Chen et al., 2016). Chez des patients répondant favorablement à un anti PD-L1, une augmentation concomitante du taux de TIL CD8+ et de l'expression du PD-L1 sur la tumeur corrèle avec la réponse à l'atezolizumab et à la survie des patients (Garon et al., 2015; Fehrenbacher et al., 2016).

Cependant, à la différence du PD-L1, la caractérisation des TILs n'est pas encore validée en tant que biomarqueur prédictif d'un traitement. Sa valeur prédictive de réponses aux immunothérapies reste actuellement basée sur des études rétrospectives. De plus, des données attestent que les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral sont phénotypiquement et fonctionnellement différentes entre la tumeur primitive et les tissus métastatiques (Bedard et al., 2013; Murtaza et al., 2015).

Les structures lymphoïdes tertiaires (TLS)

Les TLS sont des structures composées de cellules immunitaires ayant une organisation similaire à celle des organes lymphoïdes secondaires. Ils sont constitués d'une zone riche en lymphocytes T contenant aussi des DC matures, adjacents à un follicule de lymphocytes B, le tout entouré de plasmocytes. Les TLS sont présents au niveau du stroma, de la marge d'invasion, ou au centre de plusieurs tumeurs (Sautès-Fridman et al., 2019). Les TLS représentent des sites privilégiés pour la présentation locale des antigènes tumoraux aux cellules T ainsi que dans la promotion de l'activation cellulaire B et T. Leur organisation spatiale supporte le développement de réponses B dépendantes des LT. Leur présence est associée à un pronostique favorable dans plusieurs cancers (poumon, colon, sein, tête et cou, pancréas, estomac, rein, ou mélanome), et défavorable dans le cancer du foie (Fridman et al., 2017). Récemment trois études publiées dans la revue *Nature*, ont démontrées que les TLS présents dans la tumeur avant traitement augmentaient les chances de réponses à l'immunothérapie (Cabrita et al., 2020; Helmink et al., 2020; Petitprez et al., 2020).

Les macrophages

On distingue deux type de macrophages, les macrophages M1 activés sous IFN-γ, qui expriment fortement les molécules HLA de classe II et les molécules de costimulation CD80/CD86 et son caractérisés par la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNF-

α et produisent des ROS et des NO. Les macrophages de type M2 sont induits pas les cytokines IL-4, IL-10 et IL-13 produites par les Th2, ils expriment l'arginase I et aussi beaucoup de molécules HLA de classe II mais qui ne permettent pas une présentation antigénique efficace. Ils produisent les cytokines TGF-β et IL-10 (Rhee, 2016). Tandis que les macrophages de type M1 ont été identifiés comme étant associés à un bon pronostique, les macrophages M2 qui prédominent dans les tumeurs (TAM, tumor associated macrophages) sont quant à eux associés à un mauvais pronostique dans plusieurs cancers (Galon and Bruni, 2020). En 2017, une étude a montré que les TAM de modèles murins et humains exprimaient PD-1 et que le blocage de PD-1/PD-L1 *in vivo* augmentait la phagocytose des macrophages, et réduisait la croissance tumorale permettant d'allonger la survie des modèles de souris porteuses de cancer d'une manière dépendante des macrophages (Gordon et al., 2017). Dans une cohorte de patients atteint de mélanome, une corrélation entre la présence de TAM et une réponse défavorable à l'anti-PD1 a été retrouvée (Neubert et al., 2018).

d. Signature Interféron

Le séquençage de l'ARN est utilisé pour caractériser le profil des gènes de la tumeur et du microenvironnement tumoral. Plusieurs plateformes de technologie génomique de haute sensibilité se sont développées ces dernières années (PCR à temps réel, microarray, NanoString n-Counter).

La signature de gènes validée dans de nombreux essais cliniques est la signature IFN-γ (Havel et al., 2019). L' IFN-γ, produit en grande partie par les lymphocytes T activés est une cytokine qui joue un rôle de régulation important dans l'immunité anti-cancéreuse (Shankaran et al., 2001). Les gènes clés de la signature inflammatoire IFN-γ incluent des marqueurs des LT cytotoxiques (CD8, granzyme, perforine), des cytokines Th1, des chimiokines (CXCL9, CXCL11, ou CXCR3), des molécules HLA de classe II et d'autres gènes liés à la réponse immunitaire (IDO1) (Gibney et al., 2016). Tout d'abord, il a été montré dans différents types de cancers que la signature immunitaire IFN-γ+ est associée à un pronostique favorable (Havel et al., 2019). Chez des patients traités par immunothérapie (poumon, mélanomes, tête et cou, estomac), il a été rapporté qu'un taux élevé d'ARNm d'IFN-γ était associé à une meilleure réponse aux thérapies anti-PD-1/PD-L1 (Gao et al., 2016; Ayers et al., 2017; Karachaliou et al., 2018). Une étude de phase I/II a montré qu'une signature IFN-γ composée par une forte expression des ARNm des 4 gènes suivant *IFN*-γ, *LAG3, CXCL9*, et *PD-L1*, analysés avant traitement, était associée à un meilleur taux de réponse clinique de patients atteints de cancers du poumon et de cancers urothéliaux (Higgs et al., 2018).

Au-delà de la signature IFN-γ, d'autres signatures géniques peuvent être aussi constituées des pistes dans la recherche de biomarqueurs des immunothérapies, notamment toutes celles

impliquant des gènes associés dans la résistance aux traitements. Par exemple, des mutations de la voie β-cathénine, de JAK1/2, de la β2 microglobuline, de SKT11 sont associés à une résistance aux immunothérapies (Spranger et al., 2015; Zaretsky et al., 2016; Skoulidis et al., 2018). Des mutations dans les gènes SERPINB3 et B4 qui codent pour des inhibiteurs de protéases ayant un rôle dans l'apoptose, sont associés à des réponses cliniques favorables sous anti-CTLA4 (Riaz et al., 2016).

A noter que ce type d'analyse génique nécessite d'avoir accès à du tissu frais et de l'ARN, ce qui peut se révéler complexe pour certaines tumeurs tel que le cancer bronchique.

La table 2 ci-dessous résume les principaux biomarqueurs identifiés dans le microenvironnement tumoral.

Biomarqueurs	Méthodes	Validation en essai clinique de phase III	Association avec une réponse clinique favorable	Type de cancers
Expression de PD-L1	Immunohistochimie	Oui	Positive pour un seuil de PD-L1+> 50%	Plusieurs
TMB	Séquençage haut débit NGS de gènes sélectionnés ou génome entier	Oui	Positive pour un TMB élevé	Mélanome, Cancer du poumon, rein
TILs	Immunohistochimie sur le parempchyme de la tumeur et front d'invasion	Non	Positive pour une densité forte de Tils CD8+ Négative pour un infiltrat FoxP3+, Macrophages	Plusieurs
Signature de gènes immunitaire de type IFN-γ	Microarray ou RNAseq du transcriptome	Non	Positive pour une signature IFN-γ ou de cellules T inflammées	Plusieurs
Signature de gènes immunitaire de type mutation	Séquençage haut débit NGS de gènes sélectionnés ou génome entier	Non	Négative pour des mutations β cathénine, JAK1/2, β2 microglobuline, SKT11	Cancer du poumon et mélanome
	Séquençage génome entier	Non	Positive pour des mutations SERPINB3/4	Mélanome
Clonalité du TCR	RNAseq du TCR	Non	Positive pour une stabilité du clonotype du TCR	Mélanome
Hétérozygotie du HLA de classe I	Polysolver	Non	Négative pour une perte d'hétérozygothie de l'allèle HLA-I	Mélanome

Table 2 : Biomarqueurs potentiels prédictifs de réponses aux inhibiteurs de checkpoints identifiés au sein du microenvironnement tumoral. Méthode de détection, Validation en essai clinique de phase III, association positive ou négative avec une réponse favorable aux immunothérapies et dans quels types de cancers.

Les observations cliniques de l'utilisation potentielle de ces facteurs en tant que biomarqueur prédictif de réponses aux immunothérapies, ont amené les chercheurs à proposer des outils de stratification des patients rationnalisés sur la base de la présence de plusieurs de ces facteurs au sein du microenvironnement tumoral.

Un concept nommé Immunoscore pour la stratification des patients est venu avec l'observation que le type, la densité et l'emplacement des cellules immunitaires au sein du site tumoral pourrait prédire la survie de patients atteints de cancer colorectal (Galon et al., 2006, 2012).

Pour la première fois une classification immunitaire des tumeurs a été proposée, sur la base de leur infiltration immunitaire, introduisant la notion de «chaud» (hautement infiltré et inflammatoire) et de «froid» (non infiltré) (Chen and Mellman, 2017; Galon and Bruni, 2020; Galon et al., 2012). Aujourd'hui, en plus de la composante TILs, la classification des tumeurs intègre d'autres paramètres comme l'expression de PD-L1, la signature génique, la charge mutationnelle, la préexistence de réponses T anti-tumorale. Les tumeurs dites chaudes sont infiltrées par des cellules immunitaires, des LT CD8, des chémokines favorisant le recrutement des LT dans la tumeur, une signature de gènes de type IFN-γ, une expression de PD-L1 induite par l'IFN-γ, une expression de néoépitopes. Les tumeurs froides qui comprennent les tumeurs « immune desert », ne sont ni inflammatoires, ni infiltrées, contiennent donc très peu de LT CD8, expriment peu PD-L1, et peu/pas de CMH I, ont une charge mutationnelle faible et sont infiltrées plutôt par des cellules immunosuppressives telles que les macrophages et les MDSC (De Guillebon et al., 2020).

Un troisième type de tumeur a été décrit, il s'agit des tumeurs « immune excluded », qui sont caractérisées par un nombre important de cellules immunitaires mais qui ne pénètrent pas dans la tumeur (Chen and Mellman, 2017; Cristescu et al., 2018) (Figure 9).

Ce type de classification rétrospective a montré que les réponses aux immunothérapies varient en fonction du type de groupe auquel appartiennent les tumeurs. Les tumeurs chaudes étant les plus à même de répondre aux immunothérapies, alors que les tumeurs froides ne répondent pas. Les tumeurs « immune excluded » quant à elle, seraient plus susceptibles de répondre à des stratégies thérapeutiques de combinaison (Sharma et al., 2017; Galon and Bruni, 2019).

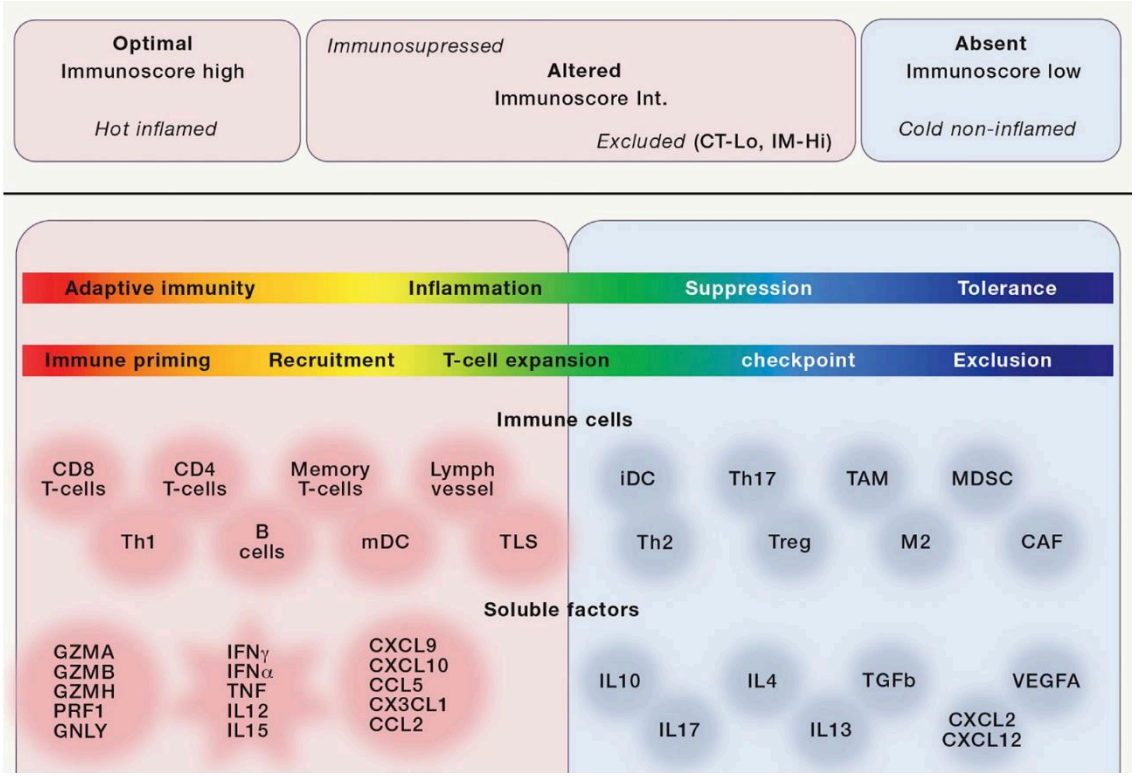


Figure 9 : Classification des tumeurs selon l'infiltrat immunitaire préexistant. Trois grandes catégories peuvent être identifiées : Immunité optimale (tumeurs chaudes), immunité altérée (phénotype immunodéprimé ou exclusion des cellules immunitaires), et immunité absente (tumeurs froides). Les cellules immunitaires et facteurs solubles sont illustrés pour ces 3 catégories (Galon and Bruni 2020).

3. Biomarqueurs systémiques

Comme nous venons de le décrire, les principaux biomarqueurs de réponses aux inhibiteurs de checkpoints les plus avancés pour une utilisation clinique sont issus de biopsie réalisée avant tout traitement. Ce sont des biomarqueurs statiques qui sont difficilement évaluables de manière réitérative dans le temps, à la différence d'un biomarqueur dynamique qui permettrait de pouvoir manager le traitement. Le sang périphérique représente donc un site d'intérêt pour l'identification de biomarqueurs potentiels dynamiques et non invasifs. On distingue là encore plusieurs types de biomarqueurs cellulaires, moléculaires et solubles.

a. LDH

Les cellules cancéreuses consomment beaucoup de glucose, impliquant une augmentation de l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) dont un taux sérique important avant traitement est fréquemment associé à un mauvais pronostique (Zhang et al., 2015). Dans le mélanome avancé, le taux de LDH est un puissant facteur pronostique (Balch et al., 2009). Concernant sa valeur prédictive de réponses aux immunothérapies, il a été montré que de

faibles taux de LDH avant traitement étaient associés à une meilleure survie sous anti-PD-1 et sous anti-CTLA-4 de patients atteints de mélanome (Weide et al., 2016; Zhao et al., 2019).

b. Les taux de lymphocytes, neutrophiles et éosinophiles, et le NLR

Il a été rapporté à plusieurs reprises qu'un taux de lymphocytes élevé avant traitement est associé à une amélioration de la survie des patients traités par inhibiteurs de checkpoints atteints de mélanome et cancer du poumon non à petites cellules (Manson et al., 2016; Prelaj et al., 2019). Dans le cadre d'une thérapie par anti-CTLA-4, l'amélioration de la survie a été souvent rapportée comme étant associée à des valeurs faibles avant traitement de neutrophiles, de monocytes et de fort taux d'éosinophiles (Ferrucci et al., 2016; Martens et al., 2016; Prelaj et al., 2019). Des changements dynamiques de ces marqueurs après traitement ont aussi été rapportés en lien avec des effets cliniques bénéfiques, par exemple, l'augmentation sous anti-CTLA-4 du taux de lymphocytes et du taux d'éosinophiles améliore la survie des patients (Delyon et al., 2013; Weide et al., 2016).

Le NLR correspond au rapport du taux de neutrophiles sur le taux de lymphocytes. Son augmentation s'est révélée comme un signe avant-coureur d'un pronostic plus sombre dans différents cancers (Bowen et al., 2017). Dans le cadre du traitement par immunothérapie, sa faible valeur est souvent présentée comme un facteur prédictif de réponses favorables aux anti-CTLA4, un ratio inférieur à 5 étant associé à une augmentation de la survie globale et sans progression de patients traités pour un mélanome métastatique (Ferrucci et al., 2015; Nakamura et al., 2016; Moschetta et al., 2017). Une récente méta-analyse a montré qu'un NLR élevé correspondait à de sombres survies globales et sans progressions de patients traités par différentes immunothérapies (anti-CTLA-4, anti-PD-1 ou les deux) pour trois cancers différents ; poumon, mélanome et cancers uro-génitaux (Sacdalan et al., 2018). Des changements dynamiques de ce marqueur ont aussi pu être analysés, et deux études dans le cancer du rein et du poumon ont mis en évidence le rôle prédictif de la mesure du NLR sous traitement. En effet, il a été montré qu'une augmentation de ce taux après 6 semaines de traitement par inhibiteur de checkpoint par rapport à la baseline était associée à des diminutions de la réponse objective au traitement, de moins bonnes survies globales et sans progression contrairement aux caractéristiques cliniques observées après une baisse de ce taux (Lalani et al., 2018; Suh et al., 2018).

c. Marqueurs fonctionnels et d'activation des lymphocytes T

Plusieurs marqueurs caractérisant les lymphocytes T ont été étudiés par cytométrie en flux : la molécule de costimulation ICOS (Inducible T cell co-stimulatory), le marqueur de prolifération Ki67, les marqueurs d'activations CD28 et PD-1, des marqueurs de différenciation tel que CCR7. Leur augmentation sous immunothérapie pourrait traduire l'efficacité des

traitements. Par exemple, ICOS et Ki67 sont retrouvés surexprimés sur les lymphocytes T CD4 et CD8 après traitement par anti-CTLA-4 (Wang et al., 2012). En effet, sous anti-CTLA-4, la liaison B7-CD28 permet l'activation des lymphocytes T ICOS+. Plusieurs études ont montré que l'augmentation après thérapies, des cellules CD4 exprimant ICOS est associée à une efficacité de l'anti-CTLA-4 après une ou deux cures (Ng Tang et al., 2013; Di Giacomo et al., 2015).

La diminution du taux sanguin de ces marqueurs d'activation traduit surtout une baisse de l'efficacité des thérapies associé à des rechutes. Par exemple, les patients présentant une faible concentration de lymphocytes T CD8+ Ki67+ avant traitement présentent un risque accru de rechute. Un faible taux de LT CD8+ naïves et centrales mémoires exprimant CCR7 analysées avant traitement, est associé à un risque de récidive chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou (Czystowska et al., 2013).

Une autre étude a montré que les lymphocytes T CD8 PD-1+ sont retrouvés en plus grande quantité après traitement par anti-PD-1 (Kamphorst et al., 2017). Dans cette étude, les patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules à un stade avancé et répondant partiellement à l'anti-PD-1, présentaient à 80% des lymphocytes T CD8+ exprimant PD-1 et Ki67 dans les 4 semaines suivant le début du traitement. En revanche, 70% des patients présentant une progression de la maladie arboraient des taux de CD8+PD-1+Ki67+ tardivement augmentés voir pas du tout après traitement. Malgré la taille de la cohorte relativement faible, l'hypothèse émise par les auteurs suggère que le blocage de la voie PD-1 conduit à l'expansion des LT CD8 PD-1+ spécifiques de tumeur, résultant en leur détection transitoire, et serait suivie d'une augmentation de ces cellules T spécifiques au niveau du site tumoral constatée dans plusieurs études expliquant la réponse favorable aux traitements.

L'expression des marqueurs CD27 et CD28 qui permet de déterminer l'état de différentiation des LT a récemment été étudié comme biomarqueur prédictif de réponse aux immunothérapies. La présence de fort taux dans le sang de LT CD4+ très différenciés caractérisés phénotypiquement par $CD27^{-}CD28^{low/-}$ avant traitement permet d'identifier des patients répondeurs à une thérapie par anti-PD-1/anti-PD-L1 (Zuazo et al., 2019). Ces patients sont également caractérisés par une forte expression de Ki67 sur les LT CD4 avant traitement.

d. <u>Les cellules myéloïdes suppressives</u>

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) correspondent à une population hétérogène de cellules immatures constituées de progéniteurs myéloïdes et qui peuvent se différencier en macrophages, granulocytes ou cellules dendritiques (Veglia et al., 2018). Les MDSC jouent un rôle fondamental dans la résolution de l'inflammation et le maintien de l'homéostasie des réponses immunitaires. Ce sont des cellules suppressives impliquées dans de nombreuses situations pathologiques dont le cancer.

Chez l'homme, on distingue deux grands types de MDSC, les MDSC monocytaires (M-MDSC) proche des monocytes et les MDSC polymorphonucléaires (PMN-MDSC) qui ont une morphologie et un phénotype de neutrophile. Récemment une sous-population de M-MDSC immatures, appelée e-MDSC (« early-stage MDSC »), et représentant moins de 3%, a été décrite comme étant composée de progéniteurs et de précurseurs myéloïdes (Gabrilovich, 2017).

Dans la plupart des cancers, les PMN-MDSC sont majoritaires représentant plus de 70%, comparée au M-MDSC qui représentent à peine 20% des MDSC totales.

Du fait de l'hétérogénéité de ces cellules, et à cause du manque de marqueur spécifique, leur caractérisation phénotypique s'avère complexe. En effet, différentes combinaisons de marqueurs myéloïdes sont utilisées et les stratégies pour identifier les MDSC sont en conséquence très variable d'un laboratoire à un autre (Damuzzo et al., 2015). Jusqu'à 10 phénotypes différents sont ainsi décrits pour caractériser les M-MDSC et les PMN-MDSC. L'existence de ce grand nombre de phénotype souligne le manque de standardisation dans ce domaine et a conduit à plusieurs programmes d'harmonisation qui ont permis récemment de définir des marqueurs phénotypiques requis pour distinguer les sous-populations de MDSC (Bronte et al., 2016; Mandruzzato et al., 2016; Veglia et al., 2018) (Table 3).

Ainsi, les M-MDSC, peuvent être identifiées grâce à l'expression des marqueurs membranaires suivants : CD14, CD11b et une faible expression de HLA-DR.

Les PMN-MDSC peuvent être caractérisés par l'expression de : CD11b, CD15 ou CD66b, et l'absence d'expression du CD14. Récemment, un récepteur au lectine, LOX-1, lectin-type oxidized LDL receptor 1, a été identifié comme un potentiel marqueur des PMN-MDSC pouvant les distinguer des neutrophiles sans gradient de ficoll (Condamine et al., 2016).

Type de MDSC	Phénotype minimal
M-MDSC	$CD11b^{+}CD14^{+}HLA\text{-}DR^{low/-}CD15^{-}$
PMN-MDSC	$CD14^{-}CD11b^{+}CD15^{+}$ (ou $CD66b^{+}$)
e-MDSC	Lin^{-} (CD3/14/15/19/56) $HLADR^{-}CD33^{+}$

Table 3 : Marqueurs phénotypiques minimaux d'identification des MDSC. Adapté de (Bronte et al., 2016; Veglia et al., 2018)

Ces cellules sont caractérisées par un fort pouvoir immunosuppresseur qu'elles exercent sur les acteurs de l'immunité anti-tumorale comme les NK, les LB mais surtout les LT par divers mécanismes pouvant aboutir à la survie des cellules tumorales, l'angiogenèse et l'inhibition de l'immunité anti-tumorale. Ainsi, elles sont très souvent associées négativement à la survie des patients. Malgré l'hétérogénéité de phénotypes permettant de les décrire, de manière générale, quelque soit le sous-type, une accumulation de MDSC est retrouvée dans le sang

de patients atteints de différents cancers (poumon, mélanome, colon, rein, thyroïde, myélome…) et est associée à un impact négatif sur la survie des patients (Vetsika et al., 2014; Diaz-Montero et al., 2014; Angell et al., 2016; Yang et al., 2017) (Table 4). Une méta-analyse confirme que les MDSC en quantité importante dans le sang constitue un facteur indépendant de mauvais pronostique chez les sujets atteints de tumeurs solides (Zhang et al., 2016). Dans le mélanome et le cancer du sein, les quantités de PMN-MDSC et de M-MDSC corrèlent avec le stade de la maladie et les métastases (Jordan et al., 2013). Les MDSC sont également retrouvées associées à la résistance aux traitements, notamment, à la résistance à une chimiothérapie à base de sels de platine pour des patients atteints de cancer du poumon (Huang et al., 2013).

	Phénotype MDSC	Type de cancer où le pronostique est défavorable
M-MDSC	CD14+HLA-DRlow/-	Mélanome, Tête et cou, Poumon, Foie, Rein, Vessie, Cancers hématologiques, Gastro-intestinaux
	CD14+IL-4Rα+	Mélanome, Rein, Cancers gastro-intestinaux
	CD14+HLA-DR-L-4Rα+	Glioblastome
	CD34+CD14+CD11b+CD33+	Cancer de l'ovaire, poumon
	CD11b+CD14+CD33+ CD33+HLADR-	Cancer du rein
PMN-MDSC	Lin-HLADR-CD33+CD11b+ CD14-CD15+	Mélanome, Cancers gastro-intestinaux
	CD11b+CD14-CD33+	Cancers tête et cou, poumon, hématologiques
	CD33+HLADR-CD15+	Cancers gastro-intestinaux, rein
	CD15+IL-4Rα+	Mélanome, Rein, Cancers gastro-intestinaux
	CD11b+CD15+CD66b+	Cancer du rein
	CD11b+CD14-CD15+	Cancer du rein, tête et cou, poumon, vessie et urtère
	CD11b+CD15+	Cancer du pancrés

Table 4 : Association entre plusieurs phénotypes de MDSC et le pronostique des patients atteints de cancer. Différents phénotypes caractérisant les M-MDSC et les PMN-MDSC ont été décrits comme étant de mauvais pronostique dans plusieurs cancers. Adapté de (Solito et al., 2014)

Etant donné leur forte association négative avec la survie des patients, leur valeur prédictive de réponse aux immunothérapies a été étudiée dans plusieurs études. Ces études ont rapporté que des taux relativement faibles de MDSC mesurés avant traitement corrèlent à une meilleure survie des patients traités par inhibiteurs de checkpoints (Kitano et al., 2014; Meyer et al., 2014; Martens et al., 2016). Chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules, les M-MDSC présentes en quantité élevée avant traitement sont associées à une mauvaise survie des patients traités par nivolumab (Delaunay et al., 2018). En revanche aucun impact pronostique n'a été identifié avec le taux de PMN-MDSC ou e-MDSC. Une autre

étude a pourtant montré que les taux de PMN-MDSC exprimant LOX-1 étaient en quantité plus faibles chez les patients de cancers du poumon répondeurs à l'anti-PD-1 (Kim et al., 2019).

e. Les cytokines

Les cytokines inflammatoires, ou de type activatrices produites par les L T cytotoxiques et Th1 (IFN-γ, TNF-α), les cytokines inhibitrices (TGF-β et IL-10) ou encore les cytokines pro-angiogéniques peuvent être étudiées en tant que biomarqueur potentiel de réponse aux immunothérapies. Par exemple, il a été montré que l'IFN-γ, l'IL-18 et la chimiokine inductible par l'IFN-γ, ITAC, qui attire les LT activés étaient augmentés lors d'une thérapie anti-PD-L1. Cependant, aucune association n'est retrouvée avec l'efficacité clinique (Herbst et al., 2014; Powles et al., 2014).

Une étude récente a démontré la valeur prédictive d'un niveau élevé de l'IL-8 plasmatique associée à l'efficacité de l'immunothérapie. Une diminution rapide de l'IL-8 circulante après le début du traitement a été observée chez les répondeurs à l'immunothérapie dans une petite cohorte de patients atteints de mélanome et de cancer du poumon non à petites cellules (Sanmamed et al., 2017).

En outre, il a été rapporté que des concentrations sériques élevées avant traitement d'angiopoïétine-2 étaient corrélées avec une survie inférieure chez les patients atteints de mélanome traités par inhibiteurs de checkpoints. Cependant, cet effet n'a atteint une valeur significative uniquement chez les patients traités par ipilimumab en association avec le bevacizumab (anticorps anti-VEGF), mais pas chez les patients traités par ipilimumab seul (Wu et al., 2017). Ainsi les cytokines, intervenant dans l'activation ou l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale, ont probablement un impact sur la réponse aux immunothérapies, mais leurs actions sont complexes et ne sont pas encore clairement identifiées en tant que biomarqueur.

f. PD-L1 soluble

Dans le sang, on trouve le PD-L1 sous différentes formes, il peut être soluble ou extracellulaire, exprimé à la surface des exosomes et des microvésicules. Des niveaux élevés de PD-L1 soluble (sPDL1) ont été associés à un pronostic plus sombre dans plusieurs types de cancers tels que les cancers du rein, myélome multiple, lymphome B, cancer du poumon, et hépatocarcinome (Zhu and Lang, 2017). Les patients dont les concentrations de sPD-L1 avant traitement étaient les plus élevées avaient tendance à présenter une maladie rapidement évolutive après un traitement à base d'ipilimumab. Les augmentations de sPD-L1 après 5 mois de traitement anti-PD-1 et anti-CTLA-4 étaient corrélées à des réponses partielles chez les patients atteints de mélanome (Zhou et al., 2017).

g. Les exosomes

Les exosomes sont des nano-vésicules extracellulaires dont la taille varie de 40 à 100nm. On sait maintenant qu'elles influencent le système immunitaire et l'environnement extracellulaire car elles transportent des molécules actives comme des protéines et acides nucléiques spécifiques du tissus dont elles sont originaires (Chaput and Théry, 2011). A leur surface, les exosomes expriment des protéines qui sont cruciales pour la signalisation des lymphocytes T comme les molécules du CMH (Daassi et al., 2020).

Les exosomes peuvent exprimer PD-L1 et sont ainsi capable de supprimer les réponses T anti-tumorales. Par conséquent, il a été démontré que des concentrations plus élevées de PD-L1 exosomale avant un traitement anti-PD-1 étaient associées à un pronostic défavorable chez les patients atteints de mélanome (Chen et al., 2018; Poggio et al., 2019). L'augmentation des exosomes exprimant PD-L1 après 2 mois d'immunothérapie correspond aux patients qui vont pouvoir répondre au traitement (Chen et al., 2018). En effet, le blocage de la voie PD-1 augmente la production d'IFN-γ par les cellules T $PD1^+$ $CD8^+$ et cet IFN-γ induit à son tour l'expression de PD-L1 par diverses cellules dans le microenvironnement tumoral; cependant, cette expression accrue de PD-L1 ne devrait pas être inhibitrice car les thérapies anti-PD-1 bloquent toute interaction entre PD-1 et PD-L1.

h. ADN tumoral circulant

L'ADN tumoral circulant (ctDNA ,circulating tumor DNA ou cfDNA, cell free DNA) permet d'identifier des altérations génétiques spécifiques de la tumeur, telles que les mutations somatiques, la perte d'hétérozygotie, les fusions de gènes, la variation du nombre de copies de gènes et les changements de méthylation de l'ADN (Snyder et al., 2019). L'ADN tumoral circulant est analysé par séquençage à partir de plasma ne contenant pas de leucocytes. Les mutations drivers telles que EGFR, KRAS, Braff, peuvent être identifiées à partir de ctDNA. Ce test est utilisé en pratique courante dans le cadre du diagnostic et du suivi des thérapies ciblées dans plusieurs types de cancers (Merker et al., 2018). Il a été montré dans le mélanome et le cancer colorectal, que le niveau de ctDNA mesuré dans le plasma augmentait en fonction de la charge tumorale et pouvait prédire la récidive des patients après traitement (Lipson et al., 2014; Tie et al., 2015; Santiago-Walker et al., 2016). Des études portant sur des patients traités par anti-PD-1 ou anti-CTLA-4 ont rapporté qu'un niveau élevé de ctDNA avant thérapie et qui était maintenu pendant le traitement, était associé aux plus mauvaises caractéristiques cliniques en terme de survie globale et de survie sans progression des patients (Cabel et al., 2017; Lee et al., 2017).

De manière intéressante, le TMB peut aussi être identifié à partir de ctDNA, représentant un outil intéressant pour avoir accès de manière simplifiée à la charge mutationnelle. Récemment, il a été montré l'existence d'une corrélation entre la charge mutationnelle mesurée dans la

tumeur et dans le sang de patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules (Gandara et al., 2018; Wang et al., 2019b). Les auteurs ont montré chez ces cohortes rétrospectives, que le TMB mesuré dans le plasma était associé au bénéfice clinique sous traitement par atezolizumab.

i. Diversité du TCR

Dans le sang, il a été montré qu'une immunothérapie à base d'anti-CTLA-4 entraine une diversification du répertoire TCR, laquelle est associée à une réponse au traitement. La stabilité des clones après immunothérapie correspond à de meilleures survies, ce qui a été également montré dans la tumeur (Cha et al., 2014; Tumeh et al., 2014).

Malgré de nombreuses associations entre la mesure de ces facteurs sanguins et la réponse clinique des patients sous immunothérapie, aucun n'est à ce jour validé pour une utilisation en clinique (Table 5).

Biomarqueur	Méthodes	Validation en essai clinique de phase III	Association avec une réponse clinique favorable	Type de matériel biologique
ADN tumoral circulant	Séquençage de gènes sélectionnés ou du génome	Non	Négative pour un taux élevé avant IT	Plasma
Taux de lymphocytes, éosinophyles, NLR	Numération sanguine	Non	Positive pour un NLR peu élevé avant IT	Sang total
LT activés	Cytométrie en flux	Non	Positive pour un taux de CD4+ICOS+ élevé avant IT	Sang total PBMC
Cellules immunosuppressives	Cytométrie en flux	Non	Négative pour un taux élevé avant IT	Sang total PBMC
Cytokines	ELISA, Multiplex, Luminex	Non	Positive pour un taux élevé d'IFN-γ, IL-18, ITAC Négative pour un taux élevé de TGF-β	Sérum
LDH	Dosage enzymatique	Non	Négative pour un taux élevé de LDH	Sérum
Diversité du TCR	ImmunTraCeR	Non	Positive pour une diversité du TCR riche	Sang total

Table 5 : Biomarqueurs potentiels prédictifs de réponses aux inhibiteurs de checkpoints identifiés au sein du compartiment sanguin. Méthode de détection, validation en essai clinique de phase III, association positive ou négative avec une réponse favorable aux immunothérapies et dans quels types de cancers.

4. Le microbiote

Le microbiote constitue une interface entre l'environnement, le régime alimentaire, l'immunité de l'hôte, et l'immunité anti-tumorale. Le microbiote intestinal est beaucoup étudié depuis ces dernières années et notamment plusieurs études ont montré une association entre la présence de certaines bactéries intestinales et la réponse aux inhibiteurs de checkpoints (Chaput et al., 2017; Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018; Routy et al., 2018). Les différentes espèces de bactéries commensales n'ont pas le même impact sur le statut répondeur ou non des patients traités par immunothérapies (Chaput et al., 2017). Ainsi, les bactéroïdes seraient enrichies chez les non répondeurs, alors que les ruminococus ou les firmicutes et notamment les bactéries de type Akkermansia muciniphila seraient associées aux patients qui répondent aux inhibiteurs de checkpoints (Chaput et al., 2017; Routy et al., 2018). De plus, la diversité accrue du microbiote, indépendamment de l'identité de l'espèce de bactérie, a été associée avec une réponse améliorée aux immunothérapies. A l'heure actuelle, les mécanismes précis des interactions qui modulent la réponse aux immunothérapies restent encore très hypothétiques et doivent encore être élucidés mais il est possible que l'existence de mimétisme moléculaire entre les motifs antigéniques des bactéries et les néo-antigènes tumoraux puisse expliquer une meilleure réponse immunitaire anti-tumorale face à certaines bactéries (Vétizou et al., 2015). La compréhension de ces interactions pourrait permettre de modifier la flore intestinale d'un patient afin de favoriser ses chances de répondre aux immunothérapies.

5. Evolution vers un biomarqueur composite

Comme ainsi constaté, aussi bien dans le TME que dans le compartiment sanguin, une multitude de facteurs ont été étudiés pour leur valeur prédictive de réponse aux immunothérapies. Néanmoins, à ce jour, seule l'expression de PD-L1 est utilisée en clinique. Pour les autres biomarqueurs bien que l'existence d'un lien entre leur présence avec la réponse aux traitements soit démontrée dans certaines études, plusieurs problématiques ne permettent pas à ce jour de les déployer en pratique :

- absence de validation prospective mais identification rétrospective sur des petits groupes de patients issus d'essai clinique
- valeur pronostique faible
- standardisation difficile
- Applicabilité à la pratique clinique compliquée

Cette longue liste de potentiels biomarqueurs s'agrandissant sans cesse, reflète la complexité de la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, dans un contexte tumoral multifactoriel, associant des données relatives à la tumeur et son microenvironnement, à l'hôte et à son immunité, l'intérêt d'un biomarqueur composite associant plusieurs biomarqueurs se positionne maintenant dans les perspectives futures.

Etant donné la faible valeur prédictive négative du PD-L1, plusieurs études se sont intéressées à le combiner avec un autre biomarqueur. Par exemple, dans le cancer bronchique, la combinaison de l'évaluation de l'expression de PD-L1 avec les TIL $CD8^+$ en tant que signature prédictive de la réponse aux immunothérapies semble surpasser la valeur prédictive de réponse de ces deux biomarqueurs analysés séparément (Fumet et al., 2018). En outre, en associant le taux de PD-L1 au taux de mutation TMB, il est possible d'obtenir une valeur de prédiction de réponse plus forte, d'autant que ces deux biomarqueurs ne sont pas corrélés entre eux (Ready et al., 2019).

De plus, il devient évident que pour pallier aux limites liées aux biomarqueurs statiques, leur combinaison avec des biomarqueurs pouvant être réitérés dans le temps, permettrait un suivi dynamique du statut immunitaire des patients. Ensemble, les biomarqueurs statiques et systémiques pourraient augmenter le pouvoir de sélection des patients répondeurs (tumeur chaude, peu de cellules immunosuppressives circulantes, et expression de marqueur d'activation) ou au contraire identifier les patients réfractaires. Aussi, l'analyse de la signature immunitaire adaptative dans des échantillons prélevés au cours du traitement (biomarqueur systémique) pourrait permettre d'orienter le traitement différemment, de le poursuivre ou de l'arrêter (immunosuppression très forte, immunité T trop faible…) (Figure 10).

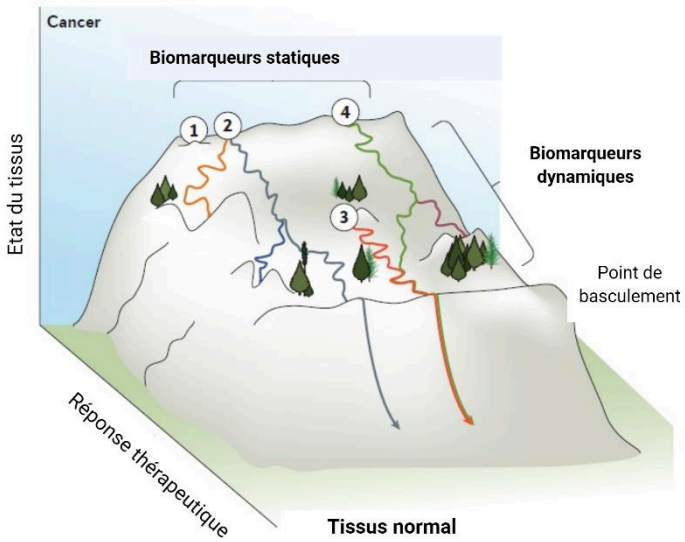


Figure 10 : Intérêt de la combinaison des biomarqueurs statiques et dynamiques dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancers : scénarios de réponses. Le traitement est initié sur la base de l'analyse des biomarqueurs statiques et dynamiques, puis le traitement est adapté sur la base des biomarqueurs dynamiques, modifiant ainsi la réponse thérapeutique des patients (exemple patients 2 et 4). Le patient 1 a une résistance intrinsèque et ne présente aucune réponse au traitement. Adapté de (Lesterhuis et al., 2017)

Dans ce sens, l'équipe de Blank, a émis l'hypothèse d'un concept appelé « cancer immunogramme » qui prend en compte l'analyse de 7 paramètres différents (associés au TME ou systémiques) pour visualiser le statut dynamique des interactions immunitaires d'un patient, afin d'établir un score qui permettrait d'adapter la stratégie thérapeutique (Figure 11) (Blank et al., 2016). Sur cette base, d'autres équipes ont développé leur propre immunogramme en considérant d'autres paramètres, par exemple, une étude a évalué les paramètres immunologiques impliqués dans les différentes étapes du cycle de la réponses anti-tumorale chez 20 patients atteints de cancer du poumon (Karasaki et al., 2017).

En conclusion, même si le cancer immunogramme reste pour l'instant à son état de concept, il ouvre les perspectives de la combinaison entre les différents types de biomarqueurs, remettant fortement en cause l'avenir d'un biomarqueur seul et unique.

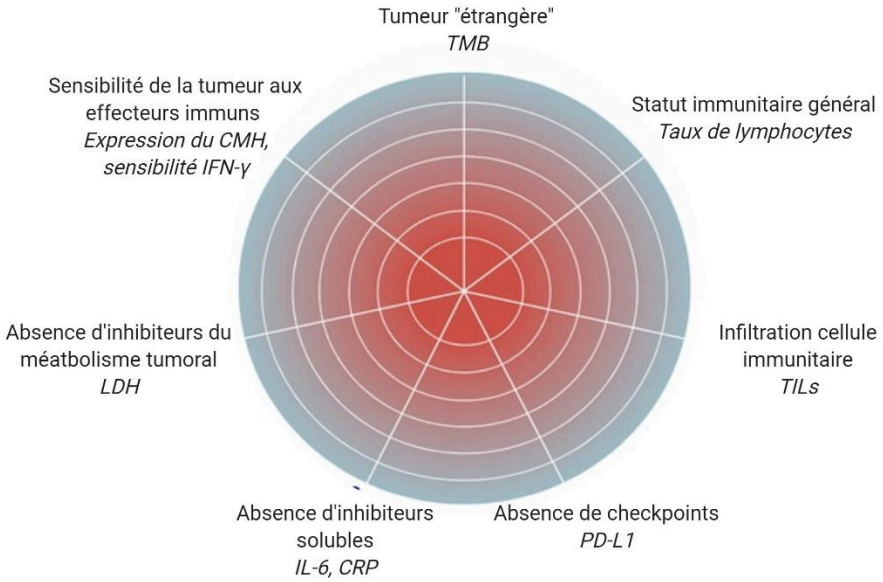


Figure 11 : Le cancer immunogramme. Radar plot de 7 paramètres représentant des biomarqueurs du TME ou systémiques. La caractérisation de l'ensemble de ces biomarqueurs chez un patient permettrait de tracer une ligne dans le cercle connectant les 7 valeurs et représentant l'état immunitaire d'un patient. La couleur bleue correspond aux états les plus bénéfiques alors que le rouge correspond aux états indésirables. Adapté de (Blank et al., 2016).

II. Outils d'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs dans le sang

A. Sang périphérique, carrefour de circulation des cellules immunitaires

Le cycle de la réponse immunitaire anti-tumorale ou « Cancer-Immunity cycle » en anglais, est défini comme une série d'événements fonctionnels nécessaires à l'aboutissement d'un contrôle efficace de la croissance du cancer par le système immunitaire (Chen and Mellman, 2013) (Figure 12). L'activation d'une réponse immunitaire appropriée est un processus extrêmement orchestré, essentiel au maintien de la tolérance et à la protection contre les lésions tissulaires induites par le système immunitaire.

Le processus est d'abord initié au niveau de la tumeur via la libération d'antigènes générés par les cellules tumorales (étape 1). Les antigènes de tumeurs sont ensuite capturés par les cellules dendritiques qui, lors de la migration vers les ganglions lymphatiques, présentent les antigènes capturés sous la forme de peptides fixés aux molécules HLA de classe I et de classe II aux lymphocytes T (étape 2). Il en résulte une activation des effecteurs de la réponse T contre les antigènes de tumeurs (étape 3). Ces cellules activées vont rejoindre la circulation sanguine puis attirées par un gradient de chimiokines vont atteindre le site tumoral (étape 4) où elles vont pouvoir s'infiltrer dans la tumeur (étape 5). Ces lymphocytes T activés vont pouvoir reconnaitre et lier les cellules tumorales par une interaction avec leur TCR et l'antigène en question présenté par le CMH (étape 6). La synapse immunologique va être renforcée par les molécules d'adhésions. Les cellules cancéreuse cibles sont ensuite éliminées par différents mécanismes faisant intervenir des cytokines comme l'IFN-γ, des couples de récepteurs/ligands et le système perforine/granzyme (étape 7). La mort de ces cellules cancéreuses entraine le relargage d'autres antigènes de tumeurs, ré-initiant le cycle de la réponse et permettant à chaque cycle d'augmenter la diversité et l'intensité des réponses immunitaires.

Les étapes de ce cycle sont contrôlées par de nombreux événements activateurs et inhibiteurs qui régulent les réponses T anti-tumorales, et lorsque l'équilibre entre ces facteurs est rompu, la balance va pencher en faveur de la prolifération tumorale.

Intervenant dans toutes les étapes du cycle, les lymphocytes T au cœur de l'induction de la réponse anti-tumorale sont détectables au niveau de trois compartiments : la tumeur, le sang et les ganglions (Chen and Mellman, 2017). Un processus dynamique existerait entre ces trois compartiments (Figure 12). Plusieurs études soutiennent cette hypothèse, en effet, il a récemment été montré que certains clones T identifiés dans la tumeur pouvaient être retrouvés

également au niveau du sang (Huang et al., 2017; Guo et al., 2018). Le sang pourrait donc être un reflet de ce qu'il se passe au niveau de la tumeur. Dans ce sens, l'analyse de la réponses T spécifique d'antigènes de tumeurs mesurée dans le sang constitue un potentiel biomarqueur systémique attractif.

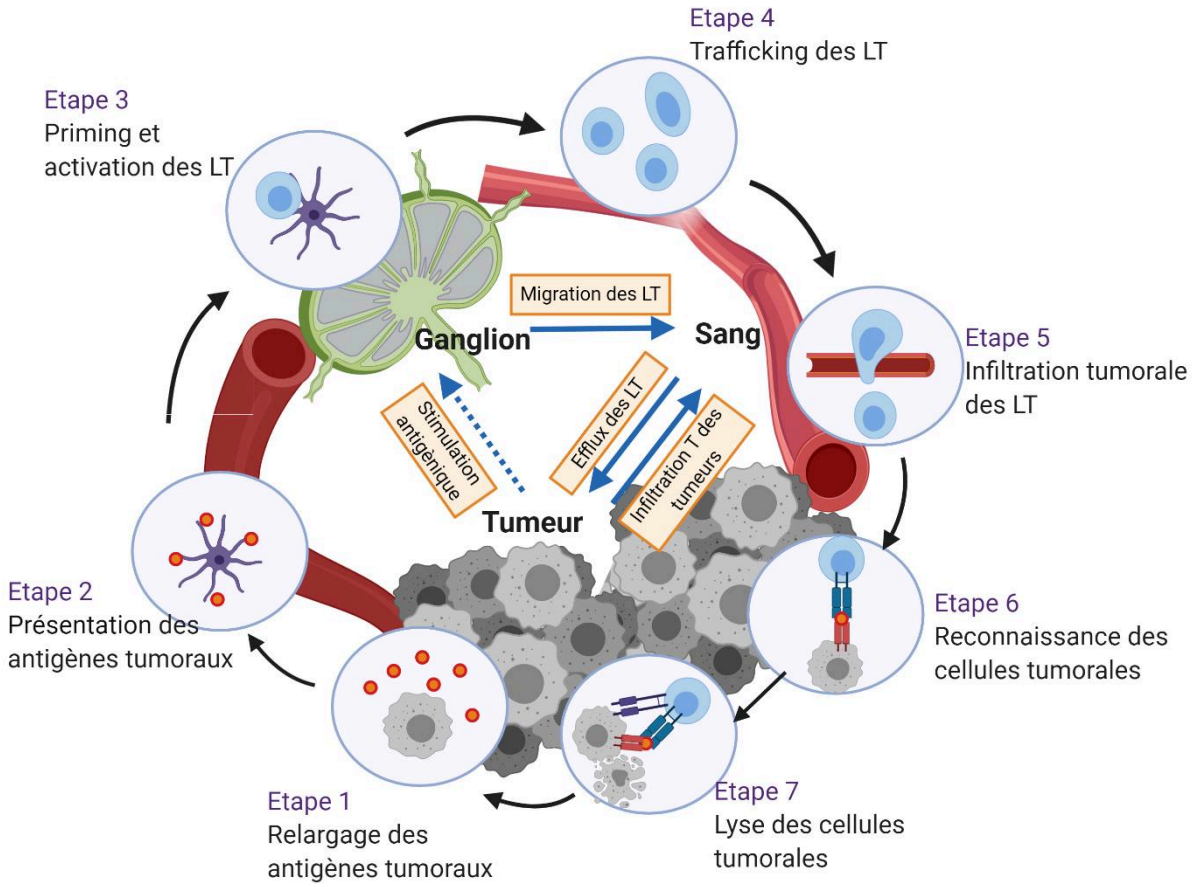


Figure 12 : Le cycle de la réponse T anti-tumorale. Le cycle est caractérisé par 7 étapes consécutives qui se répètent et mènent à l'établissement de la réponse T anti-tumorale. Un processus dynamique existe entre la tumeur, à l'origine de l'activation des LT au niveau du ganglion, la migration des LT des ganglions vers le sang, leur infiltration dans la tumeur et leur efflux vers le sang.
Adapté de (Chen and Mellman 2013 et 2017)

B. Les antigènes associés aux tumeurs

L'existence d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique du cancer repose sur la présence d'antigènes de tumeurs surexprimés par les cellules tumorales et reconnus spécifiquement par les lymphocytes T (DuPage et al., 2011, 2012).

Les antigènes de tumeurs sont exprimés par les cellules cancéreuses qui lorsqu'elles subissent une transformation maligne, acquièrent souvent des antigènes associés à la tumeur (TAA, tumor associated antigens) qui résultent soit de mutation de gènes codant pour des

protéines (qui créent des néo-antigènes) soit d'altération épigénétiques (menant à une expression ectopique d'antigènes qui sont normalement exprimé durant le développement embryonnaire ou dans les testicules) (Fridman et al., 2017). Le premier antigène de tumeur a été découvert en 1991 par l'équipe de Thierry Boon (van der Bruggen et al., 1991), qui a montré que MAGE-A1 pouvait être reconnu par les lymphocytes T CD8 d'un patient atteint de mélanome. Ce n'est ensuite que 8 ans plus tard, que le premier antigène reconnu par des lymphocytes T CD4 a été décrit (Wang et al., 1999). Depuis, de nombreux autres TAA ont pu être identifiés dans la plupart des cancers humains (Vigneron and Stroobant, 2013).

Les antigènes de tumeurs peuvent être regroupés en différentes familles selon des critères d'expression dans les tumeurs et les tissus sains, et en fonction de la nature des épitopes issus de ces antigènes. On peut les classer en 5 grandes familles.

1. Les antigènes cancer/testis

Les antigènes du groupe cancer/testis ou cancer/germline sont codés par des gènes de la ligne germinale. Ils sont ainsi exprimés dans les cellules germinales durant le développement fœtal et sont ré-exprimés dans différents types de cancers mais le plus souvent leur expression est limitée (ou réduite) dans les tissus normaux adultes. Les antigènes cancer/testis sont considérés comme des antigènes partagés ou publics car leur expression est partagée par différents types histologiques de cancers. Ce groupe contient de nombreux antigènes, qui sont classés en famille, parmi elles, la famille des gènes MAGE qui contient à elle seule 25 gènes et qui, avec l'antigène NYESO-1, représentent deux exemples d'antigènes très bien étudié (Coulie et al., 2014). Ces antigènes sont connus pour leur grande immunogénicité capables d'induire des réponses T et des réponses B (Lim et al., 2012). Ils présentent un faible risque d'auto-immunité car les cellules germinales n'expriment pas ou très faiblement les molécules HLA de classe I (Simpson et al., 2005). Leur expression est différente entre les cancers, certains cancers comme le cancer de la vessie, mélanome, ovaire et poumon ont une forte expression de ces antigènes, alors que d'autres expriment des niveaux intermédiaires voir faibles (cancers du rein et du colon) (Salmaninejad et al., 2016).

2. Les antigènes de différenciation

Les antigènes de différentiation sont issus de gènes de différenciation exprimés de façon limitée par les tissus sains, mais surexprimés ou amplifiés dans les tissus cancéreux correspondants. Ils représentent un groupe très diversifié de protéines, de glycoprotéines et

de glycolipides. La tyrosinase, Melan-A/MART-1 et gp100 sont des exemples d'antigènes de différenciation du mélanome (Cox et al., 1994; Bakker et al., 1995; Kawakami et al., 1994). Le plus étudié est Melan-A/MART-1, reconnu pour son immunogénicité, contre lequel les réponses T spécifiques sont reportées dans 10 à 75% des patients atteints de mélanome (Nagorsen et al., 2003). Le groupe des antigènes de différentiation comprend également des antigènes issus de la prostate, l'antigène prostatique spécifique (PSA) et la phosphatase acide prostatique (PAP), qui sont surexprimés par la tumeur. De plus, l'expression de plusieurs antigènes oncofœtaux semblent augmenter dans de nombreux tissus cancéreux adultes, notamment, l'antigène carcinoembryonnaire CEA qui est fortement exprimé dans le cancer du côlon. Plusieurs antigènes de ce groupe ont été utilisés comme cible thérapeutique dans de nombreux essais cliniques, mais s'agissant d'antigène du soi, un éventuel risque d'auto-immunité existe et a été constaté à plusieurs reprises avec le CEA (Parkhurst et al., 2011).

3. Les antigènes surexprimés

Les antigènes surexprimés sont présents en plus forte quantité dans la tumeur par rapport aux cellules saines qui les expriment également. Ce groupe englobe plusieurs antigènes parmi lesquels on peut citer les protéines anti-apoptotiques (survivine), les protéines suppresseurs de tumeurs (p53), la télomérase (développée dans la partie IV). Suivant le type de tumeur, ils sont surexprimés à différents niveaux par les cellules tumorales. Par exemple, tandis que la télomérase est surexprimée chez plus de 90% des cancers humains (Shay and Bacchetti, 1997), l'oncogène HER2/neu est surexprimé dans 20 à 25% des cancers du sein (Goebel et al., 2002). Ils ont la spécificité de conférer la plupart du temps un avantage essentiel à la survie des cellules tumorales, cela fait partie des mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire (Parmiani et al., 2007). Leur surexpression dans le tissu tumoral par rapport au tissus sain est également variable entre les antigènes. Le facteur de transcription WT-1 est exprimé de 10 à 1000 fois plus dans les cellules leucémiques que dans les cellules normales (Cilloni et al., 2002). C'est cette différence de niveau d'expression entre les cellules tumorales et les cellules normales qui est responsable de la mise en place d'une réponse lymphocytaire T spécifique contre l'antigène.

4. Les antigènes mutés et les néoantigènes

Les antigènes mutés et les néoantigènes sont issus de mutations synonymes et d'altérations génétiques accumulées par les cellules tumorales au cours de la cancérogénèse. Les antigènes mutés correspondent à des mutations drivers qui comprennent des mutations

inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeurs et des mutations activatrices dans les oncogènes (HER2, ALK, ROS-1, EGFR ou KRAS). En général, ces mutations sont essentielles à la croissance tumorale et sont partagées par plusieurs types de tumeurs (Heemskerk et al., 2012).

Les néoantigènes, quant à eux proviennent pour la plupart de mutation unique (Ward et al., 2016; Yarchoan et al., 2017b). Ces mutations qui altèrent la séquence codante, sont la cause de l'expression de protéines mutées par les cellules cancéreuses uniquement. De plus, comme ces antigènes ne sont pas présents dans les cellules normales, ils sont protégés des mécanismes de tolérance périphérique et centrale (Schumacher and Schreiber, 2015). L'identification de ces néoantigènes nécessite le séquençage du génome entier de chaque tumeur individuelle afin d'identifier les gènes mutés et de sélectionner les peptides dont les motifs devraient être présentés par les allèles HLA du patient. Il a été montré que ces néoantigènes pouvaient être reconnus par les lymphocytes T (Robbins et al., 2013; Linnemann et al., 2015). Néanmoins, seule une petite fraction de ces peptides mutés est en effet présentée par le CMH. De plus, la fréquence des mutations et donc le potentiel de néoantigénicité des tumeurs diffère dramatiquement entre les différents types de cancers ainsi qu'entre les patients eux-mêmes (Schumacher and Schreiber, 2015). L'hétérogénéité génétique au sein des tumeurs peut rendre une partie des cellules tumorales moins dépendante d'une mutation oncogène donnée, l'expression de ces néoantigènes peut donc être perdue au cours du temps (Gerlinger et al., 2012). Bien que les immunothérapies personnalisées à base de néoantigènes sont techniquement possible, cette approche est de telle envergure qu'il est pour l'instant difficilement envisageable de l'utiliser pour une thérapie à large échelle.

5. Les antigènes viraux

Les antigènes viraux sont dérivés de virus associés aux tumeurs (virus Epstein Barr, papillomavirus, virus des hépatite B et C). Les tumeurs viro-induites représentent 10 à 15% des cancers humains. Les protéines virales sont produites au sein de la cellule tumorale et donnent lieues à des peptides antigéniques qui peuvent être reconnus par les lymphocytes T. Dans le cas du virus HPV, les protéines virales E6 et E7 sont exprimées continuellement au cours de l'infection associée au cancer du col de l'utérus et du canal anal et sont impliquées dans la tumorigénèse, ce qui les rend à priori indispensable pour le virus (Tindle, 1996).

Type d'antigènes		Exemples	Expression tumorale	Expression tissus normal
ANTIGNENES PARTAGES	Cancer/testis	MAGE, RAGE, GAGE, NYESO-1	mélanome, lymphome, myélome, poumon, vessie, colon, sein	Cellules germinales, placenta, cellules ovarienne
	Différentiation	Melan-A/MART-1, gp100 PSA, PAP, PSMA CEA, mamaglobine-A	Mélanome Cancer de la prostate Cancer du colon Cancer du sein	Mélanocytes, prostate, colon tissus épithélial
	Surexprimés	Her2/neu, p53, TERT, survivine, WT-1	Oeophage, foie, pancréas, colon, sein, ovaire, vessie, prostate, lymphomes	Ubiquitaire à de faibles niveaux
ANTIGENES DU NON SO	Viraux	HPV E6/E7 HBV, HCV EBV	Col de l'utérus, canal anal, ORL Hepatocarcinome, Lymphome de burkitt	Absent
	Mutés ou Néoantigènes	B-cathénine Kras EGFR	Mélanome, foie Poumon, colon, pancréas Poumon	Absent

Table 6 : Les cinq grandes familles d'antigènes de tumeurs. Exemples d'antigènes de tumeur pour chaque famille et expression dans la tumeur et dans le tissu sain. Adapté de (Buonaguro et al., 2011; Tartour et al., 2011).

C. Les techniques de détection des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs dans le sang

Les T spécifiques d'antigènes de tumeurs ont été détectés dans le sang de patients depuis la découverte des premiers antigènes de tumeur en 1991 par T Boon et son équipe (Coulie et al., 2014). Durant les années qui ont suivi, plusieurs stratégies ont été développées dans le but d'identifier des antigènes de tumeurs, de déterminer leur immunogénicité et d'analyser les réponses T capables de les reconnaitre, justifiant une possible utilisation en thérapeutique. En répertoriant une liste non exhaustive d'environ soixante-dix études s'étant intéressée à la réponse T spécifiques naturelle contre différents antigènes tumoraux dans le sang de patients atteints de cancer, on peut constater que les techniques majoritairement utilisées dans ces études sont l'ELISpot, le marquage des cytokines intracellulaires (ICS) et les multimères de peptide de CMH (p-MHC). La prolifération ainsi que les dosages de cytokines par ELISA sont très rarement employés (Annexe 1 et Figure 13).

Nous allons détailler ces trois principales méthodes ci-dessous et présenter leurs avantages et limites dans la détection des réponses T anti-tumorales spécifiques d'antigènes de tumeurs.

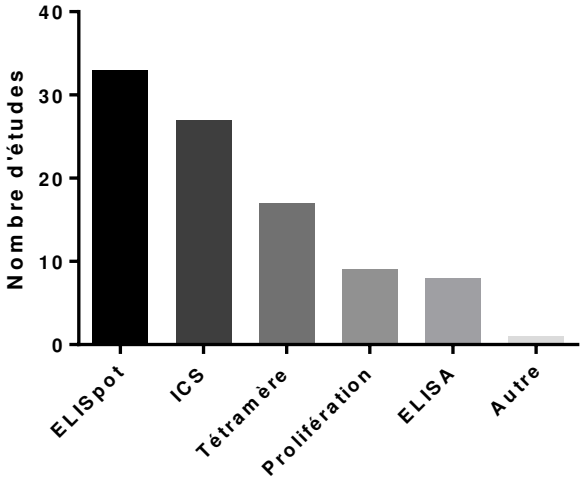


Figure 13 : Méthodes utilisées pour l'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeur chez des patients atteints de cancers. Fréquence des méthodes utilisées dans les études listées en annexe 1 ayant analysé les réponses T circulantes spécifiques de TAA avant tout traitement et non dans un but d'identification peptidique.

1. Les multimères p-MHC

«Tétramère» est le terme courant utilisé pour désigner des molécules HLA multimérisées (de classe I ou II) portant un peptide spécifique et marquées avec une sonde fluorescente. Cette méthode a été initialement mise en place pour étudier les réponses T CD8 spécifiques de virus dans le cadre des infections virales (Altman et al., 1996). Elle a ensuite été développée pour analyser les réponses lymphocytaires T notamment T CD8 spécifiques d'antigènes tumoraux dans des essais de vaccins anti-cancer et d'immunothérapies, en particulier chez des patients atteints de mélanome et de leucémies myéloïdes chroniques (Davis et al., 2011).

a. Principe

Les multimères peptide-MHC constituent une méthode d'analyse directe des LT basée sur la capacité du récepteur du LT (TCR) à reconnaitre un peptide antigénique présenté sur une molécule HLA.

Il existe donc deux grands types de multimères, ceux qui sont composés de molécules HLA de classe I permettant la reconnaissance de lymphocytes T CD8 et ceux reconnaissant les lymphocytes T CD4, qui sont composés des molécules HLA de classe II (Figure 14).

Multimères du CMH de classe I

Les multimères de classe I sont les plus répandus. Ils sont constitués d'un complexe molécules CMH HLA de classe I-peptide composé d'une chaîne légère invariante (β2-microglobuline), une chaîne lourde polymorphe et un peptide.

Le format le plus classique et le plus courant du multimère de classe I consiste en un complexe de 4 monomères de CMH recombinante qui sont byotinylés et qui vont pouvoir se lier à la

strepatvidine (tétramère) (Altman et al., 1996) (Figure 14). L'utilisation d'une streptavidine conjuguée à une molécule fluorescente va permettre la détection de ce complexe par cytométrie en flux.

La plupart des fluorochromes utilisés pour marquer les tétramères sont la phycoérythrine (PE) et l'allophycocyanine (APC), choisis pour leur brillance et pour leur qualité de marquage. Du fait de leur instabilité, les molécules du CMH doivent être multimérisées pour augmenter leur demi-vie. Il existe donc des variantes dans la multimérisation de ces molécules, cela peut être des dimères, des streptamères, des pentamères et plus récemment décrits les dextramères (complexes du CMH fixés à un squelette de dextrane) et les dodecamères (Dolton et al., 2014; Huang et al., 2016). Les dodecamères sont constitués d'une protéine centrale liée à 4 molécules de streptavidine, elle-même composé de 3 molécules de CMH soit au total 12 molécules de CMH, ce dodécamère présente une forte sensibilité avec une forte avidité et une demie vie prolongée.

La construction de tétramères, très fastidieuse à ses débuts, a subi de profondes améliorations, l'équipe de T. Schumacher, a notamment introduit l'utilisation de peptides photolabiles, sensibles aux UV qui, après exposition à une lumière de 350nm, sont clivés. La structure du complexe CMH n'est pas endommagée par cette exposition aux UV et peut de nouveau lier un autre peptide (Rodenko et al., 2006). Cela permet de créer plus facilement de nombreux multimères différents.

Aujourd'hui de nombreux multimères de classe I sont disponibles dans le commerce mais de nombreuses équipes fabriquent eux-mêmes leurs tétramères. La question de la stabilité des multimères « fait-maison » est à prendre en considération, et plus particulièrement lors d'une analyse des réponses T spécifiques sur une longue période (Gouttefangeas et al., 2019). Des recommandations concernant les procédures de cryopréservation des multimères ont été établies à la suite d'expériences menées dans trois laboratoires différents et soulignent l'intérêt d'une congélation en glycérol en évitant les cycles répétitifs de congélation-décongélation (Hadrup et al., 2015).

Multimères du CMH de classe II

Les multimères de CMH de classe II, contrairement à ceux de classe I, sont formés d'un hétérodimère composé de deux chaines distinctes qui forment le sillon de liaison à l'antigène, rendant leur construction beaucoup plus délicate (Wooldridge et al., 2009) (Figure 14). Du fait des difficultés techniques lors de leur production, ces multimères sont beaucoup moins répandus que les multimères de classe I. Néanmoins, depuis leur découverte, des progrès ont été fait au niveau de leur construction permettant d'améliorer les rendements et la stabilité des multimères pMHC II (stabilisation des chaines α et β par ajout d'un motif leucine-zipper à la place des domaines transmembranaire et cytoplasmique, ajout d'un tag histidine His en C-

terminal, pour purifier les complexes,…) (Vollers and Stern, 2008; Ayyoub et al., 2010; Schmidt et al., 2013).

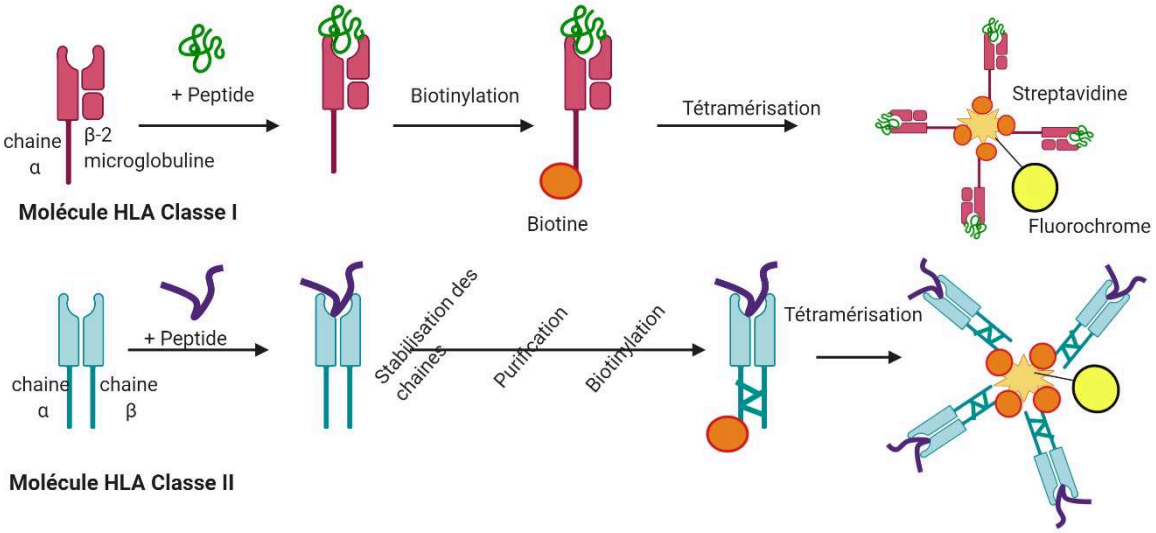


Figure 14 : Schématisation de la fabrication d'un tétramère de classe I et de classe II.

b. <u>Méthode</u>

Les multimères p-MHC sont liés à des fluorochromes, de ce fait leur utilisation repose sur la cytométrie en flux conventionnelle. En général, le marquage de multimères se fait à partir de PBMC. 1 à 3 millions de PBMC sont incubés avec les tétramères pendant 1 à 2h à 37°C ou à température ambiante (à la concentration de 10µg/ml). Bien qu'il n'y ait pas de véritable consensus sur la température optimale de marquage, il a été montré que les interactions TCR/ multimères seraient améliorées à température ambiante ou 37°C par rapport à un marquage sur glace (Rockinger, Jandus en révision dans JITC). Un cocktail d'anticorps anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8 membranaire peut ensuite être ajouté au marquage (Figure 15).

En raison du nombre et de la fréquence souvent faibles des cellules spécifiques détectées par p-MHC et de leur analyse par cytométrie en flux, l'utilisation de contrôles est fortement recommandée (Sims et al., 2010). Pour discriminer le bruit de fond de la positivité, un tétramère contrôle de même allèle que le tétramère d'intérêt mais chargé d'un peptide irrelevant peut être utilisé. Le contrôle Fluorescence minus one (FMO) peut aussi être utilisé (Jansen et al., 2018). La disponibilité des clones de lymphocytes T pour disposer d'un contrôle positif de la qualité des multimères est cependant limitée (Hadrup et al., 2015).

Le seuil de positivité de cette technique n'est pas clairement défini, les auteurs se basent sur un nombre de cellules multimères positives.

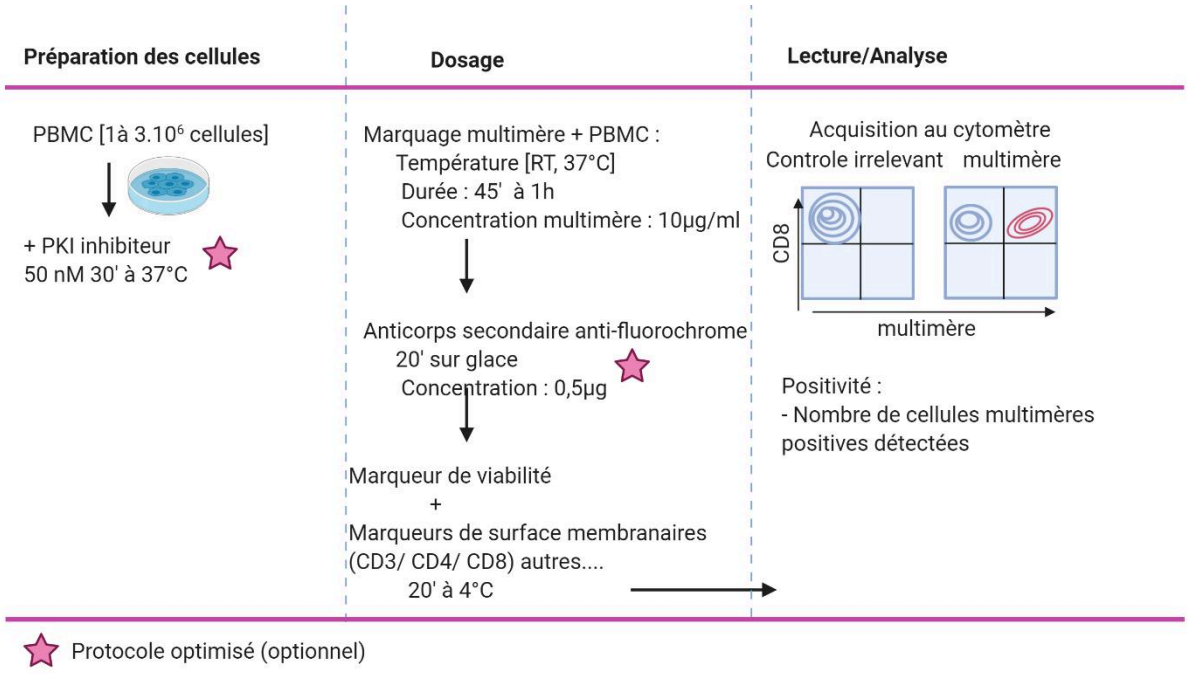


Figure 15 : Schématisation de la technique de multimère pMHC. De la préparation des cellules, au dosage et à l'analyse des résultats. Les optimisations de la technique se situent au niveau de l'ajout d'un inhibiteur de protéines kinases (PKI), de l'ajout d'un anticorps secondaire anti-fluorochrome (Cf optimisation de la technique).

c. Sensibilité

La sensibilité de cette technique dépend de la sensibilité de la cytométrie en flux qui est de l'ordre de 0.01% soit une sensibilité se situant autour de 1 pour 10 000 cellules (Davis et al., 2011).

d. Points forts

- Une analyse directe *ex vivo* sans étape d'amplification et hautement spécifique des lymphocytes T spécifiques d'un antigène tumoral.
- Information possible sur le phénotype (effecteur, mémoire, épuisé…) des LT spécifiques en combinant le marquage multimère avec des anticorps qui caractérisent les LT.
- Possibilité de trier les cellules tétramères positives qui sont viables après marquage et peuvent être triées pour réaliser des analyses complémentaires comme l'analyse de l'expression génique par PCR quantitative, ou l'analyse du répertoire T (Sarkar et al., 2008).
- Information sur l'avidité du TCR pour le peptide en question porté par les molécules HLA (Dutoit et al., 2002).

e. Limites

- Le principal inconvénient de cette technologie est qu'elle ne fournit pas d'informations sur la fonctionnalité des cellules détectées.
- Du fait de sa grande spécificité, l'analyse par tétramère se limite à un épitope donné, qui peut ne pas être représentatif de la réponse globale dirigée contre l'antigène donné. L'analyse de l'ensemble des épitopes nécessiterait une quantité de cellules trop importante.
- L'analyse de pMHC multimères reste actuellement essentiellement restreinte à l'analyse des réponses T CD8 spécifiques d'antigènes de tumeurs. En effet, plusieurs raisons rendent le tétramère de classe II complexe à utiliser : i) l'affinité entre le TCR et les molécules HLA de classe II est faible (Cole et al., 2007), ii) la contribution des co-récepteurs à l'avidité du binding pMHC de classe II est modérée, contrairement au CD8, le CD4 ne coopère pas dans cette liaison (Jönsson et al., 2016), iii) la diversité conformationnelle des multimères de classe II, iv) le haut polymorphisme des molécules HLA-DP, DQ, DR de classe II, restreignant l'analyse aux individus présentant un haplotype de classe II pour lesquelles sont disponibles les multimères de classe II (allèle DRB1 principalement) et enfin v) la faible qualité des multimères de classe II liée aux difficultés technique de leur production (Vollers and Stern, 2008).
- L'affinité du TCR requise pour le marquage du multimère pMHC est supérieure à celle requise lors de l'activation cellulaire T, pouvant entrainer une sous-estimation du nombre de LT spécifiques détectés (Laugel et al., 2007; Dolton et al., 2015). Ce qui est notamment le cas avec les réponses T spécifiques de tumeurs qui correspondent généralement à des interactions TCR-pMHC de faibles affinités, les LT de fortes affinités ayant été éliminés par les mécanismes de tolérance (Dolton et al., 2018). Plusieurs études récentes ont rapporté que les multimères pMHC standard ne permettaient pas de détecter la majorité des cellules T spécifiques et notamment des LT CD4 (Sabatino et al., 2011; Tungatt et al., 2015; Huang et al., 2016; Rius et al., 2018).

f. Optimisation

Afin de pallier aux limites de cette technique, plusieurs optimisations se sont développées ces dernières années :

- Possibilité de combiner le marquage multimère pMHC avec d'autres techniques pour avoir accès à la fonction. Récemment, un protocole permettant de détecter des LT CD4 spécifiques fonctionnels en combinant les techniques de multimères et de marquage intracellulaire (ICS) a été publié (Pastore et al., 2019). La difficulté étant que la restimulation *in vitro* avec l'antigène peut induire une internalisation du TCR, perdant ainsi la possibilité de détecter par multimères les lymphocytes T CD4 spécifiques de l'épitope (Liu et al., 2000). En comparant plusieurs protocoles de marquages différents, les auteurs ont montré que le plus optimal consistait en une stimulation préalable des cellules *in vitro* avec le peptide pendant 1h à 37°C, puis de la

fixation et de la perméabilisation des cellules, suivie de la réalisation des marquages successifs de multimères puis d'anticorps membranaires et des cytokines intracellulaires. Ce protocole permet de détecter à la fois les TCR exprimés à la surface et internalisés.

- Plusieurs protocoles ont été dernièrement développés dans le but d'améliorer la détection des cellules T spécifiques par méthode multimères p-MHC.

Par exemple, afin de prévenir l'internalisation du TCR et sa « downrégulation », des inhibiteurs de protéines kinases tel que le dasatinib peuvent être ajoutés. En prétraitant les cellules avec cette molécule, plusieurs études ont montré une augmentation du marquage (Lissina et al., 2009; Dolton et al., 2015, 2018). Cependant l'accès à la fonctionnalité des LT n'est plus accessible après cette étape.

Des anticorps anti-fluorochrome qui cross-link avec le multimère p-MHC à la surface des T améliore le marquage en permettant la stabilisation de la liaison et limitant la dissociation durant les lavages (Tungatt et al., 2015).

- Afin de palier à une des limitations majeures de cette technique qui retreint l'analyse à une spécificité unique, des marquages combinatoires ont été développés (Newell et al., 2009; Hadrup et al., 2009; Andersen et al., 2012). Le concept repose sur l'utilisation simultanée de plusieurs multimères conjugués avec des fluorochromes distincts pour analyser le même échantillon. La combinaison distincte des fluorochromes fait en sorte que chaque population puisse être identifiée individuellement et par le biais des combinaisons d'analyses, le nombre de spécificités analysées augmente de façon exponentielle (Davis et al., 2011). Cette approche combinatoire a été validée avec des multimères de classe II dans la détection de LT CD4 spécifiques de 6 épitopes du virus influenza (Uchtenhagen et al., 2016). Cette approche permet également d'augmenter la limite de détection du test, augmentant les chances de détecter des LT spécifiques d'antigènes de tumeur (Andersen et al., 2012).

- Des techniques d'enrichissement des cellules multimères positives avec des billes magnétiques ont été développées pour améliorer la détection de cellules T spécifiques. Après marquage des LT avec le multimère, des anticorps spécifiques du fluorochrome du multimère couplés à des billes magnétiques sont ajoutés. Ils vont lier les cellules multimères positives et par le bais de l'utilisation de colonnes magnétiques vont être retenu. Cet enrichissement de 50 à 100 fois plus par rapport à la population initiale améliore la sensibilité de la technique (Davis et al., 2011). Ce concept a été validé avec des lymphocytes T CD4 spécifiques de NYESO-1 et du virus Influenza (Lemaître et al., 2004). Cette méthodologie a également été utilisée dans des études de monitoring pour augmenter la fréquence de détection de lymphocytes T CD8 spécifiques de PRAME (Griffioen, 2006).

- Récemment, des plateformes de miniaturisation se développent pour détecter les interactions CMH-TCR à l'aide de puces microarray (Dey et al., 2019). Ces microarray se basent sur le même principe que pour l'expression de gènes. Permettant de screener jusqu'à 30 à 40

cellules T réactives de différents antigènes (Brooks et al., 2015). Néanmoins cette nouvelle technologie nécessite d'avoir des réponses T spécifiques de l'antigène en fréquence relativement élevées (>0.1%) car l'efficacité de capture des cellules ciblées est très faible.

2. La détection de cytokines intracellulaires

La production de cytokines intracellulaires a tout d'abord été démontrée par l'équipe de Sander et al. par une technique d'immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des cytokines à analyser (Sander et al., 1991). Plus tard, une méthode utilisant la cytométrie en flux a été développée pour améliorer le marquage intracellulaire des cellules productrices de cytokines (Jung et al., 1993).

a. Principe

Le marquage intracellulaire de cytokines (ICS, Intracellular Cytokine Staining) consiste à détecter, grâce à des anticorps couplés à un fluorochrome, les cytokines accumulées dans le cytoplasme des LT après stimulation avec un antigène d'intérêt. Le protocole d'ICS consiste donc à réaliser un marquage intracellulaire de cytométrie en flux. Compte tenu du rôle de la réponse Th1 dans l'immunité anti-tumorale, la caractérisation des cellules produisant les cytokines Th1, IFN-γ, IL-2 et TNF-α, va permettre de détecter les LT fonctionnels spécifiques de l'antigène tumoral ayant un rôle protecteur contre le cancer.

b. Méthode

Dans la plupart des cas, une étape de stimulation *in vitro* des lymphocytes avec l'antigène tumoral est réalisée avant le marquage ICS afin de permettre la détection des LT spécifiques (développée dans une partie suivante, II.C.5).

Au cours de cette étape, l'utilisation d'inhibiteurs de transports golgiens comme la monensine ou la brefeldine A sont indispensables afin de permettre l'accumulation des cytokines dans le golgi de la cellule. L'incubation des cellules en leur présence doit se situer entre 4 et 12h maximum, car au-delà ces inhibiteurs sont toxiques pour les cellules. Si la période de stimulation des cellules avec l'antigène tumoral nécessite une période plus longue, il est possible de réaliser une première incubation des cellules avec le stimulis, puis d'ajouter quelques heures plus tard, l'inhibiteur de golgi. La sécrétion d'IFN-γ par les LT Th1 est généralement analysé par ICS après 6h de stimulation peptidique, où elle se situe proche de son pic maximal de production qui est situé à 24h. La sécrétion d'IL-2 est également culminante à 24h (Duechting et al., 2017).

Après la stimulation, les LT peuvent être récupérés pour l'étape de marquage avec les différents anticorps. Généralement, 1.10^6 de cellules par condition sont marquées avec, dans un premier temps, les anticorps membranaires anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8 fluorescents. D'autres marqueurs peuvent aussi être ajoutés afin de pouvoir caractériser les LT spécifiques (mémoires, activés, épuisés). Puis les cellules sont fixées et perméabilisées avant l'ajout des anticorps intracellulaires fluorescents dirigés contre les cytokines d'intérêts. Les LT marqués sont ensuite analysés au cytométre de flux (Figure 16).

Le seuil de positivité du marquage est déterminé en prenant référence à un contrôle négatif de cellules non stimulées ou stimulées à l'aide d'un peptide irrelevant. Ce contrôle négatif ou bruit de fond s'avère indispensable pour l'ICS, en effet le bruit de fond est dépendant des conditions de stimulations et du type de cytokine analysée.

Une approche courante consiste à déterminer la positivité à partir d'un seuil (par exemple, au moins 0,05% de LT IFN-γ^+, IL-2^+ ou TNF- α^+) et à exiger qu'une réponse stimulée soit au moins 3 fois (ou 4 fois) supérieure à celle du bruit de fond contrôle (De Rosa, 2012). Une autre méthode beaucoup moins utilisée consiste à se référer à la valeur p d'un test statistique pour comparer le nombre de cellules T productrices de cytokines entre les échantillons stimulés ou non par l'antigène (Horton et al., 2007).

Généralement la positivité est définie lorsqu'il y a production d'au moins une cytokine parmi toutes celles qui sont mesurées (Horton et al., 2007).

c. Sensibilité

La détection de cellules T spécifiques par marquage intracytoplasmique de cytokines requière généralement des fréquences de cellules T spécifiques assez importante, avec une sensibilité estimée à 40 cellules spécifiques pour 1 million de PBMC, soit autour des 0,04% (Letsch and Scheibenbogen, 2003). La sensibilité de cet essai est fortement dépendante du niveau de bruit de fond détecté dans les conditions non stimulées ou stimulées avec un peptide irrelevant.

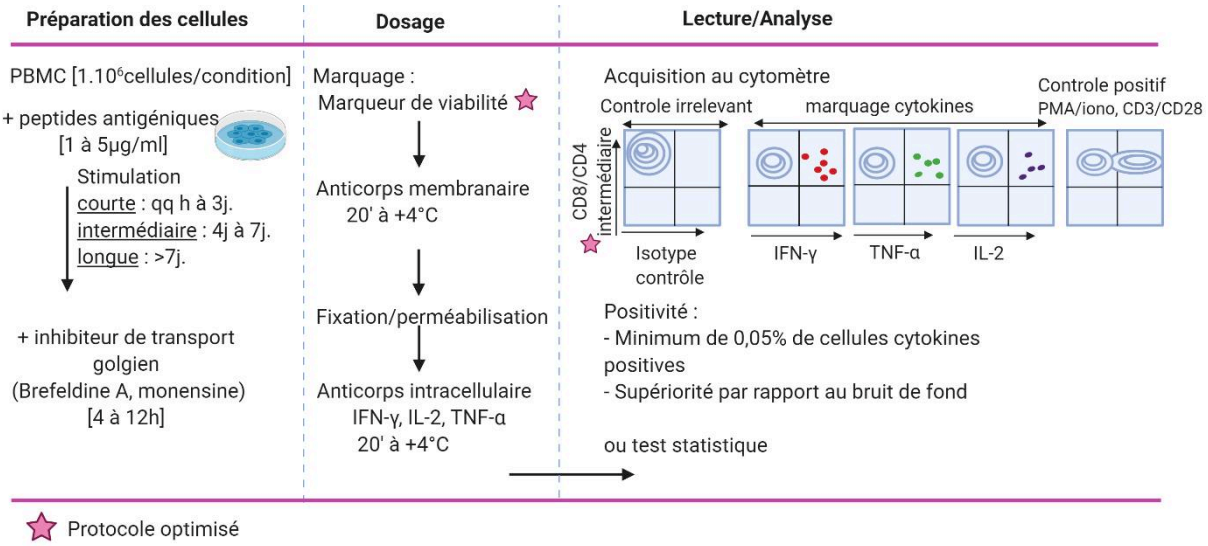


Figure 16 : Schématisation de la technique ICS. De la préparation des cellules, au dosage et à l'analyse des résultats. Les optimisations de la technique se situent au niveau de l'ajout d'un marqueur de viabilité dans le panel de marquage, et de la stratégie de fenêtrage des cellules T exprimant CD4 ou CD8 de façon intermédiaire.

d. Points forts

- Le principal avantage de l'ICS est l'analyse multiparamétrique qui permet à la fois de distinguer le type de réponse T spécifique fonctionnelle (CD4 ou CD8) et de caractériser d'autres propriétés des LT spécifiques (effecteurs, mémoires, épuisés) grâce à l'ajout de différents marqueurs d'intérêt. La validation de panels ICS multicouleur de plus de 8 fluorochromes en même temps a été démontrée dès 2006 (Lamoreaux et al., 2006; Horton et al., 2007).

- La quantification des LT spécifiques et fonctionnels contre l'antigène tumoral. En outre, l'ICS permet de déterminer la polyfonctionnalité des cellules T spécifiques. La polyfonctionnalité est décrite comme la capacité pour une même cellule d'effectuer plusieurs fonctions de façon concomitante, notamment analysables via la sécrétion de différentes cytokines. Le caractère multidimensionnel de l'analyse doit être pris en compte dans l'exploitation des résultats de polyfonctionnalité. Pour cela différentes méthodes et représentation graphiques existent, notamment la possibilité de calculer un index de polyfonctionnalité (Roederer et al., 2011; Larsen et al., 2012).

e. Limites

- L'ICS est une technique composée de plusieurs étapes qui peuvent influencer fortement la sensibilité de la technique et il n'existe pas de kit d'analyse « prêt à l'emploi ». Notamment, les pourcentages d'événements positifs rapportés dans l'ICS étant faibles (entre 0,1 et 1%) soulignent la nécessité d'obtenir des résultats hautement reproductibles et standardisés.

- La conception et l'interprétation des données de cytométrie en flux nécessitent une certaine expertise. Le choix des anticorps et fluorochromes doit être réalisé en prenant en compte les aspects relatifs à la fluorescence, par exemple l'ajout de nouveaux réactifs fluorescents a tendance à créer davantage de débordement spectral et peut impacter la sensibilité de l'analyse (Maecker et al., 2004).
- La quantité de PBMC à analyser est non négligeable, en prenant en compte les contrôles positifs et négatifs.
- Le choix des inhibiteurs de transporteurs intracellulaires, des tampons de perméabilisation/fixation doit être fait en fonction des marqueurs analysés, puisque certains marqueurs ou épitopes reconnus par les anticorps sont sensibles à l'acidification du milieu ou à la fixation/ perméabilisation.

f. Optimisation

Le principal inconvénient de l'ICS se situe au niveau de la multiplicité des étapes nécessaires à sa réalisation et qui nécessitent une validation interne préalable à la réalisation de l'essai. Plusieurs groupes ont alors travaillé depuis plusieurs années sur l'élaboration de protocoles standardisés à tous les niveaux de la technique (Lamoreaux et al., 2006; Maecker et al., 2010; Jaimes et al., 2011; Welters et al., 2012; Davies et al., 2016).
- Préparation de l'échantillon cellulaire. Dans le contexte des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs, il est préférable d'enrichir la population lymphocytaire T par ficoll plutôt que de réaliser l'ICS sur sang total (Freer and Rindi, 2013). Cependant, les PBMC isolées peuvent être utilisées fraiches ou décongelées. Bien que certaines études aient montré une perte de sensibilité en utilisant des cellules préalablement cryoconservées (Smith et al., 2015) de nombreuses raisons pratiques d'harmonisation et de standardisation appliquées au monitoring des réponses T spécifiques sont en faveur de l'utilisation de PBMC décongelées (centralisation des analyses, analyse longitudinale d'un patient). Dans ce cas, l'ajout d'un marqueur de viabilité est primordial (Horton et al., 2007).
- Utilisation de réactifs lyophilisés. Dès 2011, un programme s'intéressant aux variations inter-laboratoires d'une méthode ICS de détection de LT CD4 et CD8 spécifiques de virus a fait réaliser cette technique dans 16 laboratoires à l'aide de peptides et de panel d'anticorps lyophilisés (Jaimes et al., 2011). Ainsi les variations observées entre les laboratoires étaient limitées aux problèmes liés à l'analyse par cytométrie en flux. Aujourd'hui, il existe toujours la possibilité d'utiliser des anticorps lyophilisés ou séchés permettant de s'affranchir des variabilités liées aux étapes de marquage. Par exemple, la société Beckman Coulter propose des mix d'anticorps intracellulaires et membranaires séchés pour la réalisation de l'ICS (Duraclone®).

-Standardisation de la stratégie d'analyse. Concernant le fenêtrage d'analyse des cellules T positives en condition stimulées, celui-ci peut être déterminé à l'aide du contrôle « cellules non stimulées », cela induit moins de variabilité par rapport à des contrôles isotypiques ou à des Fluorescence minus one (FMO) (Jaimes et al., 2011).

En 2012, le programme Européen, CIMT immunoguiding programm (CIP), ayant pour but d'optimiser et d'harmoniser les protocoles d'analyses des LT s'est penché sur les stratégies d'analyse de 9 centres participant à l'optimisation de l'ICS. Etant donné que l'activation cellulaire downrégule les corécepteurs CD4 et CD8, l'analyse des LT producteurs de cytokines doit être réalisée aussi en prenant en compte ces populations de LT exprimant de manière intermédiaire le CD4 et le CD8 (Welters et al., 2012). En 2013, le consortium « Cancer Immunotherapy Consortium CIC/CRI » a également publié une étude ayant analysé les variabilités d'analyses de l'ICS entre 100 laboratoires. Quelques règles d'uniformisation au niveau de l'analyse ont pu ressortir de cette étude, notamment au niveau du fenêtrage des populations (population CD4 et CD8 intermédiaire, fenêtre de cellules positives placée de manière à ne pas inclure de cellules négatives pour optimiser le ratio signal sur bruit de fond, fenêtrage de la population lymphocytaire sans inclure les débris) (McNeil et al., 2013).

- Des marqueurs de dégranulation comme le CD107a (pour l'analyse des CTL) et d'activation tel que le CD154 (pour l'analyse des CD4) peuvent être analysés conjointement à l'ICS permettant de déterminer d'autres fonctions relatives aux cellules T spécifiques d'antigènes. Cela reste cependant très peu utilisé dans la pratique quotidienne du suivi des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs.

3. L' ELISpot

L'ELISpot est un test fonctionnel, permettant de mesurer l'activation des lymphocytes T par le biais de la production de cytokines induites après stimulation antigénique. Le premier dosage ELISpot a été réalisé en 1983 pour la numération de lymphocytes spécifiques sécréteurs d'anticorps dans des maladies auto-immunes ou pathologies infectieuses (Czerkinsky et al., 1983; Sedgwick and Holt, 1983). Actuellement, le test ELISpot est utilisé dans le cadre du diagnostic de plusieurs pathologies infectieuses bactériennes ou virales (tuberculose, CMV, EBV). La technique a été introduite dans le domaine de l'immunologie anti-tumorale en 1996.

a. Principe

Basée sur le principe de l'ELISA, le test repose sur la mesure d'une cytokine sécrétée par les LT activés en présence d'antigène. La cytokine majoritairement analysée en ELISpot est l'IFN-γ. Les lymphocytes T effecteurs stimulés par l'antigène tumoral produisent de l'IFN-γ qui se

traduit par un spot visible sur la membrane support. Le nombre de spots peut ensuite être compté à l'aide l'un lecteur spécifique.

b. Méthode

Le test est généralement réalisé à partir d'un kit commercial consistant en une plaque 96 puits de nitrocellulose ou PVDF (polyfluorure de vinylidène) coatée avec un anticorps de capture dirigé contre la cytokine à analyser. Après une étape de saturation des membranes, les PBMC, généralement préalablement stimulées *in vitro* par l'antigène tumoral, peuvent être ajoutées à raison de 100 000 cellules/puits en triplicat en présence de l'antigène. Les plaques sont ensuite incubées pendant 10 à 15h à 37°C, 5%CO_2. Après avoir retiré les cellules, les complexes anticorps-cytokines sont détectés par l'addition successive d'un anticorps secondaire de détection couplé à la biotine, du conjugué enzymatique et du substrat. La transformation enzymatique du substrat permet la visualisation de spots colorés correspondant à l'empreinte laissée par la cellule ayant produit la cytokine. Les spots peuvent être comptés à l'aide d'un analyseur d'ELISpot et la fréquence des LT spécifiques peut être calculée (Figure 17). La taille des spots donne l'information sur la quantité et la cinétique de production des cytokines, mais elle est très peu étudiée (Gouttefangeas et al., 2019).

Les critères permettant de définir la positivité d'une réponse immunitaire par ELISpot ont été revu et publié en 2010 par Moodie et al (Moodie et al., 2010). Deux tests peuvent servir de critères permettant de définir la positivité d'une réponse par ELISpot : la méthode la plus communément utilisée est une méthode empirique définie selon les deux critères suivants : positivité de plus de 5 spots pour 100,000 PBMC dans les puits expérimentaux et le double de spots dans les puis expérimentaux par rapport aux puits contrôles. La deuxième méthode basée sur un test statistique t non paramétrique compare le nombre de spots des puits contrôles par rapport au nombre obtenu dans les puits expérimentaux mais elle nécessite un nombre de réplicats élevé (six) (Moodie et al., 2010).

c. Sensibilité

C'est une technique qui présente une limite de détection très faible, située entre 4 et 7 cellules T spécifiques pour 100 000 cellules (Schmittel et al., 1997). La limite supérieure de quantification dépend de la capacité du lecteur ELIspot à dénombrer les spots, elle est située autour entre 800 à 1000 spots/puits.

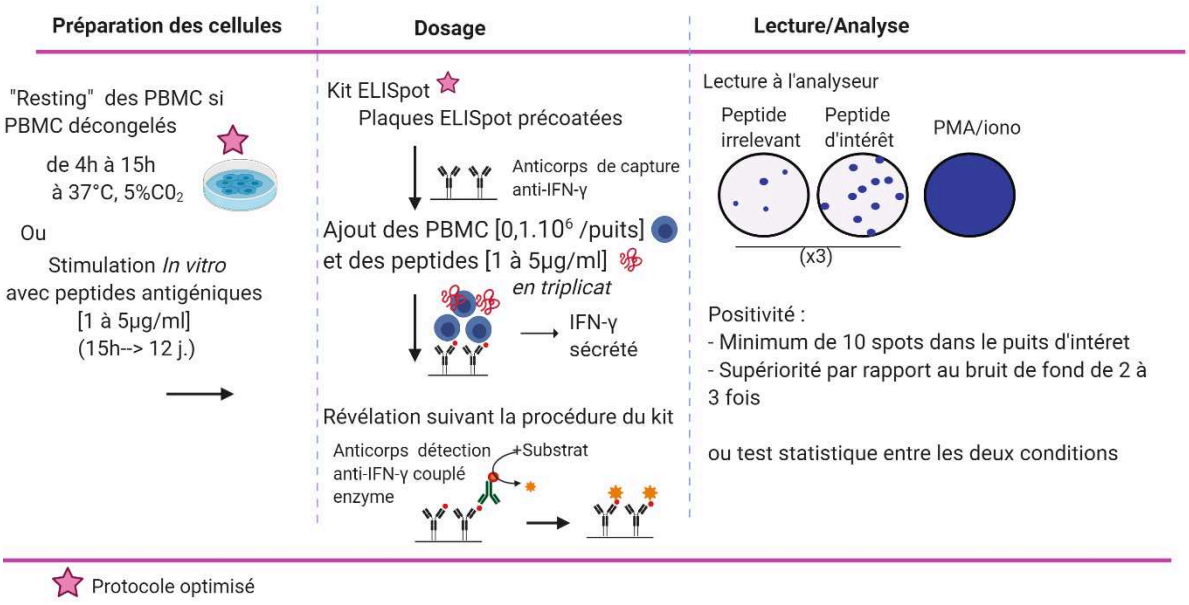


Figure 17 : Schématisation de la technique d'ELISpot. De la préparation des cellules, au dosage et à l'analyse des résultats. Les optimisations de la technique se situent au niveau de l'ajout d'une étape de « resting » /repos des cellules, et de l'utilisation d'un kit commercial.

d. Points forts

L'ELISpot est de loin le test le plus standardisé à l'heure actuelle :

- Existence de Kit ELISpot commerciaux validés selon des normes (Mabtech, Diaclone) contenant des plaques (précoatées ou non), anticorps de capture et de détection, réactifs de révélation (phosphatase alcaline-BCIP ou Peroxydase-AEC) : robustesse, simplicité d'utilisation, reproductibilité et comparabilité des résultats inter-laboratoires.

- Analyse des spots à l'aide d'un analyseur spécifique.

- Technique très sensible, et précise permettant la détection de LT spécifiques d'antigènes à de faibles fréquences grâce à un procédé immuno-enzymatique, utilisant un système de sandwich avec deux anticorps reconnaissant différents épitopes du même analyte et l'amplification du signal par le système enzyme-substrat.

- Technique peu consommatrice de cellules. Le nombre de cellules déposées dans les puits ELISpot est en général de 1.10^5 cellules/puits en triplicat, nécessitant à minima 7.10^5 cellules pour tester un antigène. Il existe une relation entre le nombre de PBMC déposés et le nombre de spots comptés dans les puits d'ELISpot, cette relation est linéaire dans un intervalle de $2{,}5.10^4$ à 1.10^6 PBMC/puits (Karulin et al., 2015), une trop forte densité de LT effecteurs entrainerait un recouvrement des spots les uns sur les autres, ne permettant pas de quantifier la quantité de cellules T spécifiques.

e. Limites

- Technique nécessitant la plupart du temps une étape préalable d'amplification des cellules T spécifiques d'antigènes de tumeurs.
- Contrairement à l'analyse des réponses T spécifiques par cytométrie en flux (multimère et ICS), l'ELISpot ne permet pas de caractériser phénotypiquement les LT spécifiques.
- Bien que l'analyse de 2 à 3 analytes en simultanée soit possible, l'ELISpot est très souvent employé en condition monoparamétrique.
- Le résultat de l'ELISpot est dépendant de la qualité de l'échantillon cellulaire étudié. Plusieurs de ces paramètres ont été mis en évidence par des groupes de travail s'intéressant à la standardisation de l'ELISpot dans le domaine du cancer (Britten et al., 2008; Janetzki et al., 2008). Des différences inter-laboratoires qui peuvent être attribuées à l'échantillon cellulaire en lui-même (viabilité, numération, repos des cellules), au type de milieu et de sérum utilisé, le suivi d'une procédure établie par du personnel qualifié et enfin l'évaluation des plaques ELISpot.

f. Optimisation

- Pour distinguer les réponses T CD4 des réponses CD8 spécifiques lorsque des PBMC sont utilisés pour le test, certains auteurs trient les cellules d'intérêt avant la réalisation du test, complexifiant néanmoins la méthode (Flecken et al., 2014; Locke et al., 2015).

Un autre moyen permettant de distinguer le type de réponse se base cette fois sur le design des peptides HLA de classe I ou de classe II. En effet, comme il existe des différences dans la longueur des peptides présentés par les allèles HLA de classe I et de classe II, il existe une spécificité de liaison propre aux lymphocytes T CD4 et CD8 permettant une activation sélective de chacun d'eux (Kiecker et al., 2004). Ainsi des peptides de 9 acides aminés de fortes affinités de liaison devront être privilégiés pour cibler les réponses T CD8 puisque la fixation d'un peptide pour les classe I limite le décrochage de ces derniers de la poche alors que des peptides de plus de 15 acides aminés seront à privilégier pour les réponses CD4. Cependant, étant donné que la distinction de la longueur du peptide n'est pas absolue, il peut tout de même arriver que les lymphocytes T CD8 soient stimulés par l'antigène présenté sur les molécules HLA de classe II, et il existe une promiscuité importante dans la liaison du récepteur des lymphocytes T au complexe HLA–peptide. De manière plus sûre, il existe maintenant plusieurs méthodes bioinformatiques qui permettent d'identifier des antigènes reconnus par les lymphocytes T CD8 et CD4.

- Le Fluorospot, est une variante de l'ELISpot qui permet de détecter plusieurs cytokines à la fois. Comme son nom l'indique, le système de détection utilise cette fois des anticorps couplés à des molécules fluorescentes. Les spots sont dénombrés à l'aide d'un lecteur ELISpot à

fluorescence et jusqu'à 4 cytokines différentes peuvent être détectées dans le même puits (Janetzki et al., 2014).

D'autres kits commerciaux non basés sur la fluorescence sont également développés pour détecter jusqu'à 4 cytokines dans le même puits. En mélangeant plusieurs systèmes de révélations avec plusieurs combinaisons enzyme-substrat (Phosphatase alcaline-BCIP ou peroxydase-AEC) pour obtenir des précipités de couleurs différentes, différentes cytokines produites par la cellule peuvent être distinguées.

Cependant, du fait de leur complexité par rapport à l'ELISpot classique, ces techniques ne sont pas utilisées dans l'évaluation des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs.

- Optimisation de la méthode : les optimisations de la méthode concernent principalement deux niveaux : la qualité de l'échantillon cellulaire de PBMC déposé utilisé pour le test et la lecture des plaques ELISpot ; deux paramètres responsables de la variabilité inter-laboratoire et inter-essai (Britten et al., 2008; Janetzki et al., 2008).

Etant donné que le test repose sur une analyse quantitative du nombre de LT producteurs d'IFN-γ, la quantité et la qualité des PBMC utilisés pour le test doivent être optimales. Pour des PBMC décongelées, Il a été décrit qu'une période de repos des cellules sur la nuit ou pendant quelques heures permettaient d'augmenter de manière significative la sensibilité de l'ELISpot (Janetzki et al., 2008; Kutscher et al., 2013; Santos et al., 2014).

Concernant l'évaluation et l'interprétation de la lecture des plaques ELISpot, des guidelines ont été publiées en 2015 (Janetzki et al., 2015). En effet, les impuretés liées aux PBMC (cellules mortes ou apoptotiques, autres types cellulaires contaminants tels que les granulocytes, plaquettes, globules rouges, précipités de protéines ou d'ADN...) peuvent interférer avec le test et créer du bruit de fond ou des artefacts visibles à la lecture des plaques. Il est important de savoir les identifier, en premier lieu pour les éviter, par exemple, un défaut d'élimination des cellules lors des lavages peut être la cause de spots présentant un aspect anormal, désintégré, avec un centre de couleur blanche. Dans un second temps, les paramètres de définition de taille, et de contraste du lecteur ELISpot peuvent être ajustés en fonction de ces artéfacts.

- Des kits ELISpot existent pour analyser des T effecteurs qui produisent d'autres types de cytokines que l'IFN-γ (IL-2, IL-10, TNF-α, granzyme B). Dans le cadre de l'évaluation de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs, les cytokines majoritairement étudiées en plus de l'FN-γ sont l'IL-2 et le TNF-α. La sécrétion de granzyme B permet de mesurer l'activité lytique des lymphocytes T CD8. Elle peut être analysée dans certaines études mais une réponse T spécifique peut exister sans qu'il n'y ait nécessairement de granzyme B sécrété. Ainsi, Babiak et al, ont reporté des fréquences de patients répondeurs proches mais inférieurs par méthode ELISpot Granzyme B comparé à l'IFN-γ (Babiak et al., 2014).

4. Analyse comparative des techniques

Des études se sont intéressées à comparer les fréquences des réponses T spécifiques d'antigènes viraux et tumoraux obtenues entre les différentes techniques. Par exemple, dans une étude publiée par Britten et al (Britten et al., 2008), les techniques d'ELISpot et tétramères ont été comparées dans 13 centres Européens avec deux phases de tests. Une première phase où les techniques n'étaient pas standardisées entre les centres, suivie d'une phase où certains points techniques considérés comme étant de forte influence ont été harmonisés. Il s'agissait notamment du nombre de cellules analysées (1 million pour les tétramères et 4.10^5 cellules par puits pour l'ELISpot IFN-γ). Ils ont ainsi pu montrer que la capacité des centres à détecter les réponses T anti virales (Flu et CMV) de fortes fréquences était la même entre les 2 phases et entre les deux techniques. En revanche, l'harmonisation des procédures lors de la deuxième phase, a permis d'améliorer la détection des réponses T spécifiques de fréquences faibles et modérées, passant ainsi de 54 à 77% pour les tétramères et de 40 à 50% de détection pour l'ELISpot. Cependant, les fréquences de réponses T spécifiques restent différentes entre les deux techniques, pouvant s'expliquer par une surestimation possible des réponses T spécifiques par l'analyse par tétramère car aucune fonctionnalité n'est mesurée par cette technique.

Une étude comparative des réponses T CD8 spécifiques de l'influenza détectées par ELISpot et par ICS chez un petit nombre de sujets (n=6) a montré une corrélation positive entre ces deux tests (Asemissen et al., 2001).

En 2003, Casati et al, ont également trouvé une corrélation des réponses T spécifiques de survivine obtenues par ELISpot et tétramères chez des patients atteints de cancer colorectal (Casati et al., 2003).

Une équipe a pu montrer dans le mélanome que des réponses CD8 anti-PRAME non détectables par analyse tétramères *ex vivo* le devenaient après isolation des tétramères par billes magnétiques. Ainsi les auteurs retrouvent la même fréquence de 4 /11 réponses CD8 spécifiques que celle obtenue avec l'ELISpot (Griffioen, 2006).

L'équipe de Dannenmann et al s'est notamment intéressée aux réponses T spécifiques de cycline D1 chez des patients atteints du cancer du rein. Bien qu'ils ont étudiés un faible nombre de patients, les 5/6 réponses T anti-cycline D1 identifiées avec l'ICS après 9 jours d'IVS ont toutes pu être détectée *ex vivo* à l'aide de tétramères A2 (Dannenmann et al., 2013).

Ainsi, le tableau ci-dessous résume les principaux avantages et inconvénients des trois méthodes de détection des réponses T spécifiques de tumeurs (Table 7).

	Multimères	ICS	ELISpot
Sensibilité	++	++	+++
Spécificité	+++	+	+
Dépendance au typage HLA	Oui	Non	Non
Détection de cellules T fonctionnelles	Non	Oui	Oui
Accès au phénotype des cellules T spécifiques	Oui	Oui	Non
Automatisation	Non	Non	Oui

Table 7 : Caractéristiques des trois techniques majoritairement utilisées pour la détection des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs.

5. Amplification *in vitro* des lymphocytes T spécifiques

La difficulté majeure de la détection des réponses T spécifiques d'antigène dans le sang est liée à leur faible fréquence qui s'explique notamment par la grande diversité du répertoire de lymphocytes T. En particulier, dans le répertoire naïf, cette fréquence est estimée autour de 60 lymphocytes T pour 1 million de cellules T naïves (1/17 000). Les réponses CD4 naïves spécifiques d'un antigène sont encore moins fréquentes, se situant entre 2 à 20 cellules pour 1 million de cellules T CD4 (Kwok et al., 2012). En revanche, les réponses antivirales mémoires en l'absence d'infections aiguës sont trouvées à des fréquences de l'ordre de 1% (Geiger et al., 2009; Bacher and Scheffold, 2013) (Figure 18).

La fréquence des réponses spécifiques d'antigènes de tumeur chez un individu sain se situe, pour les réponses CD4 entre 1 à 97 lymphocytes T spécifiques de l'antigène par million de lymphocytes T CD4 naïfs (Costa-Nunes et al., 2019). Chez des patients atteints de cancer, cette fréquence est en général plus importante (Figure 18).

Par conséquent, l'analyse des lymphocytes T spécifiques de tumeurs concerne la détection d'événements rares qui peut être améliorée grâce à une étape préalable d'amplification. L'amplification *in vitro* (IVS) des lymphocytes T spécifiques est très souvent utilisée pour l'analyse des réponses T naturelles spécifiques d'antigènes tumoraux détectées par ELISpot ou IVS, tandis qu'elle est très peu utilisée dans le cadre de l'analyse des réponses T spécifiques par multimère (Table 8).

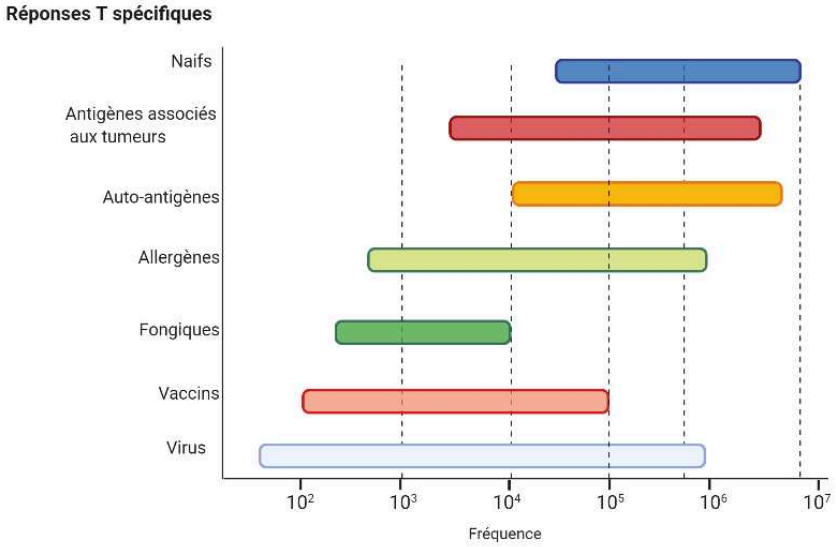


Figure 18 : Fréquence de détection des réponses T spécifiques dans le répertoire T humain détectées par méthode directe. Adapté de (Bacher and Scheffold, 2013).

L'amplification de lymphocytes T spécifiques d'antigènes se base sur la culture cellulaire *in vitro* en présence de peptides antigéniques supplémenté par des cellules ou molécules exogènes permettant de favoriser la croissance des lymphocytes T spécifiques et d'optimiser la présentation peptidique.

Plusieurs techniques d'expansion *in vitro* ont été explorées dans les années 2000 (Oelke et al., 2003; Montes et al., 2005).

a. Méthode classique d'IVS

La méthode classique, la plus simple de mise en œuvre consiste à cultiver les PBMC *in vitro* avec les peptides tumoraux et en présence de cytokines à de faibles doses pour assurer un environnement favorable à la prolifération des LT spécifiques.

Les cytokines majoritairement utilisées afin d'accroître la sensibilité du test sont l'IL-2 et l'IL-7 (Nagorsen et al., 2004). L'IL-2 est un facteur de croissance des lymphocytes T et l'IL-7 est un facteur de survie, elle inhibe l'apoptose par suppression de l'activité pro-apoptotique (Mackall et al., 2011). L'IL-7 et l'IL-2 sont généralement ajoutées en début de culture à la concentration respective de 0,5 ng/ml et 20 UI/ml.

Il a été montré que l'IL-7 ajoutée dans la culture *in vitro* réalisée en milieu AIM-V permettait d'augmenter la détection des LT CD8 spécifiques de peptides dérivés d'une enzyme pancréatique impliquée dans le diabète (Martinuzzi et al., 2008).

D'autres cytokines peuvent être utilisées lors de l'IVS : l'IL-15 ; et associée à l'IL-7, il a été montré qu'elle permettait l'amplification des CD4 et CD8 spécifiques de la tuberculine détectés

par ELISpot IFN-γ notamment pour des échantillons de PBMC décongelés (Jennes et al., 2002).

Dans le glioblastome, une combinaison d'IL-2, d'IL-15 et d'IL-21 a été décrite comme une stimulation efficace permettant d'augmenter la réactivité des lymphocytes T spécifiques de la survivine (Liu et al., 2018).

La durée de la stimulation *in vitro* peut varier, elle peut être courte entre 2 et 4 jours (Welters et al., 2006) et peut aller jusqu'à 12 jours (Zelba et al., 2014; Bailur et al., 2015).

b. Utilisation de cellules présentatrices d'antigènes

En plus de la stimulation cytokinique, les lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs peuvent être amplifiés en ajoutant dans la culture cellulaire *in vitro,* des cellules permettant d'augmenter la présentation peptidique. Dans le cas de réponses T spécifiques envers une protéine entière, cette étape est absolument nécessaire.

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices par excellence, elles sont donc souvent utilisées lors de la stimulation *in vitro* pour amplifier des réponses T CD8 spécifiques (Wölfl and Greenberg, 2014). Les DC peuvent être différentiées à partir de monocytes et maturées par différents facteurs de croissance et cocktails de cytokines, GM-CSF, IL-4, CD40-L, LPS, poly I :C/TNF-α PGE2, pendant plusieurs jours (Wölfl and Greenberg, 2014). Il a été montré que l'addition de DC maturées avec du PGE2 à l'essai permettait d'observer davantage de réponses T spécifiques de la toxine tétanique sans augmenter le bruit de fond (Navarrete et al., 2013). Afin de réduire ces étapes consommatrices de temps, une approche stimulant directement les PBMC par du GM-CSF et de l'IL-4 pendant 24h en présence du stimulis antigènique et pendant 24h supplémentaire avec le cocktail de maturation des DC permet de s'affranchir de la génération préalable des DC et a montré l'augmentation de la détection de LT spécifiques de MAGE avant et après vaccination (Martinuzzi et al., 2011).

Des cellules présentatrices d'antigènes artificielles, des lignées cellulaires immortalisées telle que des K562 ou des fibroblastes, ou encore des cellules T2 TAP-déficientes exprimant la molécule HLA-A2 peuvent aussi être utilisées ainsi que des monocytes et des PBMC autologues irradiés ou marqués avec un traceur comme le CFSE (Flecken et al., 2014; Zelba et al., 2014).

Ces techniques d'amplification *in vitro* à base de cellules présentatrices d'antigènes sont toutefois plus complexes à mettre en œuvre, nécessitent plus de temps et introduisent de la variabilité entre les différentes études (Wölfl and Greenberg, 2014; Zhenjiang et al., 2018).

c. Utilisation de molécules de costimulation

Des stimulis comme des anticorps agonistes des molécules de costimulation CD3 ou CD28 ont déjà été rapportés comme moyen d'amplification *in vitro*. Ils délivrent un signal non-

physiologique et bypass le besoin d'apporter des cytokines additionnelles. L'anticorps anti-CD28 a été utilisé dans plusieurs études portant sur l'analyse des réponses spécifiques antivirales (Waldrop et al., 1997; Betts et al., 2001; Rosen et al., 2002; Ott et al., 2004; Martinuzzi et al., 2008). Des résultats, néanmoins contradictoires sont décrits, Ott et al rapporte une augmentation de la fréquence des réponses T spécifiques productrices d'IFN-γ, sans entrainer d'avantage de bruit de fond, alors que Martinuzzi et al n'ont observé aucun bénéfice de cette stimulation. Ce type d'activation reste tout de même controversée car elle entraine la stimulation simultanée de toutes les cellules, elle reste très peu utilisée dans le contexte de détection des LT spécifiques d'antigène de tumeurs.

Parmi ces différentes méthodes d'IVS, il s'agira de trouver la plus appropriée et chaque laboratoire devra optimiser cette méthode. Une étude comparative de différentes techniques d'IVS entre 5 laboratoires Européens a montré l'existence de variabilité inter-laboratoires au niveau de la détection des réponses T spécifiques d'antigènes viraux détectés par ELISpot et tétramère (Chudley et al., 2014). Dans cette article, l'utilisation d'une culture cellulaire IVS de 13 jours standardisée utilisant 4 millions de cellules, 1µg/ml de peptides, et une supplémentation en IL-2 à 20 UI/ml montre la réduction des variations inter-laboratoires, et l'obtention d'une corrélation des réponses T spécifiques obtenues entre la technique ELISpot et tétramère.

D. Valeur pronostique des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs

Les réponses T spécifiques d'antigènes de tumeur ont été étudiées dans le sang de patients atteints de cancers depuis plusieurs années et dans de nombreuses études. En effet, les réponses T spécifiques d'antigènes ont été beaucoup utilisées dans le but d'identifier des antigènes de tumeurs pouvant apporter la preuve de leur utilisation en thérapeutique. Elles ont également été analysées dans le cadre des essais thérapeutiques de vaccination anti-cancer. Nous avons répertorié en annexe, une liste non exhaustive d'études s'étant intéressées à la réponse T spécifique analysée chez des patients atteints de cancer avant tout traitement et or identification peptidique (Annexe 1). Le but étant tout d'abord de répertorier les techniques utilisées (présentées dans la section II.C) et d'avoir une représentation de la part des études s'étant intéressées à la valeur pronostique des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs. Parmi ces 74 études répertoriées, la relevance clinique de la réponse T spécifique d'antigène de tumeurs n'a été abordée que chez 22 études listées dans la table 8, chez qui nous allons nous focaliser ci-dessous (Table 8).

- Les deux techniques majoritairement utilisées dans ces études abordant l'association avec la clinique des patients sont l'ICS et l'ELISpot avec respectivement 8 et 7 études. Parmi ces études, une seule a utilisé des multimère p-MHC de classe I pour la détection de LT CD8 spécifiques de MART-1, et tyrosinase et n'a pas trouvé d'association significative avec la survie des patients atteints de mélanome avancés mais juste un lien entre la présence de T anti-MART-1 et la progression rapide des patients (van Oijen, 2004). Comme abordé au chapitre précédent, la technique de tétramère ne permet pas de déterminer la fonctionnalité des T spécifiques, son utilisation pour une association avec la survie reste donc de faible intérêt.

Quatre études ont utilisés des techniques non conventionnelles, de type ELISA IFN-γ, prolifération et marquage CD137 (Vasquez et al., 2017; Seresini et al., 2007; Zhenjiang et al., 2018; Israyelyan et al., 2013).

La stimulation *in vitro* (IVS) a été utilisée pour la majorité des études (17/22).

- Les antigènes de tumeurs majoritairement ciblés dans ces études appartiennent aux groupes surexprimé et cancer/testis comptabilisant 16 études. Seulement 4 études ont regardé les réponses T spécifiques contre des antigènes de différentiation et parmi elle une seule étude ne l'a pas associé avec un autre antigène appartenant à une autre famille.

Les antigènes viraux HPV ont été analysés dans 4 études ciblant le cancer du col de l'utérus. Dans la majorité des études, les antigènes tumoraux utilisés correspondent à des pools de peptides.

- Les fréquences de réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs se situent en moyenne pour toutes ces études autour de 30 à 50%.

- Les réponses T CD4 et T CD8 spécifiques ont été étudiées sans distinction dans 7 études. Via l'utilisation de peptides restreints HLA classe I ou classe II ou grâce à l'ICS, les réponses T CD8 et T CD4 ont été analysées séparément et concernent 10 études pour les LT CD8 et 5 études pour les réponses T CD4 spécifiques d'antigènes de tumeurs.

- Un lien entre la fréquence ou la magnitude de la réponse T spécifique et le stade de la maladie a été étudié chez 6 études sur 7. Dans la majorité des cas, sauf pour des études dans le lymphome et le cancer colorectal, les réponses T spécifiques sont plus importantes aux stades précoces de la maladie (Fleken 2014, Janssen 2017, Bailur 2015, Ma 2018).

- Parmi les 20 études s'intéressant au pronostique des patients, 3 études n'ont pas identifié clairement de lien entre la présence de la réponse T spécifique et la survie, 17 ont retrouvé une association favorable avec la survie et 2 études (de la même équipe) une association défavorable dans le cancer colorectal. Dans deux études différentes de la table 8, il a été montré que la polarisation des réponses T CD4 spécifiques qui sont soit de type Th2 ou Th17,

via la sécrétion d'IL-4 par les CD4 spécifiques de Melan-A et la sécrétion d'IL-5 par les T spécifiques de MAGE-6 sont associées à un mauvais pronostique ou à un statut de maladie active (Zelba et al., 2014; Tatsumi et al., 2002).

- Les auteurs qui ont analysé les réponses T spécifiques contre plusieurs antigènes tumoraux, ont pu montrer l'existence d'une corrélation entre le nombre d'antigène reconnus par les lymphocytes T et la survie des patients (Flecken et al., 2014; Weide et al., 2012; Safi et al., 2017). En effet, des patients atteints de mélanome présentant des réponses immunitaires T spécifiques dirigées contre 2 antigènes ou plus parmi NYESO-1, MAGE-3, Melan-A, et survivine ont une médiane de survie globale de 24 mois en comparaison aux patients présentant des LT spécifiques d'un seul antigène (6 mois) (Weide et al., 2012). Dans le cancer du foie, le même constat a été fait avec les antigènes NYESO-1, MAGE-1, AFP et GPC3 (Flecken et al., 2014). La diversité des réponses T spécifiques contre plusieurs antigènes a donc également un rôle dans le contrôle de la maladie.

Table 8

Cancer	Famille d'antigène	Antigènes étudiés	IVS	Techniques de détection	Réponses T	Fréquence de réponse	Données cliniques		Références
							Association avec le stade	Association avec la survie	
NSCLC	Surexprimé et cancer testis	14 TAA dont Aurora Kinase, p53, RHAM, NY-ESO-1, CEA, Prame	Oui	**ELISPOT IFNγ**	CD8	Réponses contre au moins un TAA -34/51 **(67%)** Réponses les plus fréquentes : Aurora Kinase : **32,6%** HER2/neu : **32,5%** NYESO-1 : **26,1%** p53 : **25,5%**	Non évalué	Association favorable avec la PFS : -Réponses positives contre au moins 1 TAA versus pas de réponse -Réponses anti-NYESO-1	Safi et al., 2017
Glioblastome	Surexprimé	Survivine	Oui	**ELISA IFNγ**	CD4 et CD8, sans distinction	Réponses T anti-survivine : -32/102 **(31%)**	Non évalué	Association favorable avec la survie	Zhenjiang et al., 2018
Cancer du foie	Cancer testis	AFP, GPC3, NY-ESO-1 MAGE-1	Oui	**ICS**	CD8	Réponses anti-TAA : 49/96 **(51.6%)** AFP : 41/96 **(42,7%)** GPC-3 :40/96 **(41,7%)** MAGE-A1: 18/96 **(18,7%)** NYESO-1 : 24/96 **(25%)**	Réponses moins fréquentes aux stades avancés	Association favorable avec la survie Corrélation entre la survie sans progression et le nombre de TAA reconnu par les LT	Flecken et al., 2014
Cancer du col de l'utérus	Viraux	HPV E1	Non	**ELISPOT IFNγ**	non précisé	T anti-HPV :39/66 **(59,9%)**	Intensité de la réponse moins élevée chez les stades avancés mais fréquence similaire	Association favorable avec la survie globale et survie sans progression	Ma et al., 2018
Cancer colorectal	Cancer testis	CEA et 5T4	Non	**ELISPOT IFNγ**	CD4 et CD8, sans distinction	n = 87 Fréquence non précisée	Non évalué	Association dévaforable avec la survie pour les réponses T anti-CEA Pas d'association significative avec la survie pour les réponses anti-5T4	Scurr et al., 2015
Cancer colorectal	Cancer testis	CEA et 5T4	Non	**ELISPOT IFNγ**	CD4	CD4 anti-CEA : 14/34 **(41%)** CD4 anti-5T4 : 15/34 **(44%)**	Non évalué	Association dévaforable avec le taux de récidive pour les réponses T anti-CEA Pas d'association significative avec la survie pour les réponses anti-5T4 : pas d'association avec la récidive	Betts et al., 2012
Cancer du sein	Surexprimé	HER2, MUC1 et survivine	Oui	**ICS**	CD4 et CD8	50 patientes T anti-HER2 : **96%** T anti-MUC-1 : **80%** T anti-survivine : **72%**	Réponses T CD4 anti MUC-1 moins fréquentes chez les grades avancés Pas d'autres associations trouvées avec le stade	Non évalué	Janssen et al., 2017
Cancer du sein de la femme agée (>65 ans)	Surexprimé	HER2	Oui	**ICS**	CD4 et CD8 mais pronostique que avec CD8	CD4 anti-HER2 : 32/40 **(87%)** CD8 anti-HER2 : 18/40 **(47%)**	Fréquence de répondeurs CD8 anti-HER2 moins fréquente aux stades avancés	Association favorable avec la survie	Bailur et al., 2015
Mélanome	Cancer testis et différentiation	NY-ESO-1 et Melan-A	Oui	**ICS**	CD4 et CD8	CD4 anti-NY-ESO-1 : 36/54 **(67%)** CD8 anti-NY-ESO-1 : 5/54 **(9%)**	Non évalué	CD8 anti-Melan A IFN-γ+ : association favorable CD4 anti-Melan A productrice d'IL-4 et IL-17 : Association défavorable avec la survie	Zelab H et al. 2014
Melanome	Cancer testis et différentiation	NY-ESO-1 et Melan-A	Oui	**ICS**	non précisé, pas de distinction	T anti-NYESO-1 : 49/94 : **(52,1%)** T anti-Melan-A : 37/94 **(39,4%)**	Non évalué	T anti NYESO-1 : association favorable avec la survie T anti-Melan-A : pas d'association significative avec la survie	Weide B et al., 2014

Table 8 : Liste des études associant la réponse T spécifiques d'antigènes de tumeurs mesurée dans le sang et les données cliniques de patients atteints de cancer

Cancer	Famille d'antigène	Antigènes étudiés	IVS	Techniques de détection	Réponses T	Fréquence de réponse	Données cliniques		Références
							Association avec le stade	Association avec la survie	
Mélanome	Cancer testis, différentiation, et surexprimé	NY-ESO-1, Melan-A, Mage3 et Survivine	Oui	**ICS**	CD4 et CD8, sans distinction	T anti-NYESO1 : 36/84 **(43%)** T anti-Melan-A : 22/69 **(32%)** T anti-MAGE3 : 38/63 **(60,3%)** T anti survivine : 36/84 **(43%)**	Non évalué	Association favorable avec la survie pour NYESO-1, Melan-A, et MAGE3 Pas d'association pour survivine Corrélation entre la survie et la réponse contre plusieurs antigènes	Weide B et al., JCO 2012
Leucémie myéloide chronique	Cancer testis et surexprimé	RHAMM/HMMR, PRAME, G250/CA9	Oui	**ELISPOT IFNγ**	CD8	T anti-RHAMM : 8/17 **(47%)** T anti-PRAME : 7/10 **(70%)** T anti-G250/CA9 : 6/10 **(60%)**	Non évalué	Association favorable avec la rémission complète	Greiner et al., 2006
Cancer colorectal	Cancer testis et surexprimé	Ep-CAM, her-2/neu, et CEA	Non	**ELISPOT et ICS**	CD8	Réponses T contre au moins 1 des 3 TAA : -16/54 **(29,6%)**	Fréquence de réponses plus élevée aux stades avancés	Pas de différence en terme de survie entre les répondeurs et non répondeurs juste une tendance à une meilleur survies chez les non répondeurs	Nagorsen et al. 2005
Melanome avancés	Differentiation	MART-1, Tyrosinase, et gp100	Non	**Tétramère**	CD8	T anti-MART-1 : 33/62 **(53%)** T anti-Tyrosinase : 17/62 **(27%)** T anti-gp 100 : 1/62 **(2%)**	Non évalué	Pas d'association significative avec la survie pour MART-1 et Tyrosinas.	van Oijen et al., 2004
Lymphome non hodgkinien	Surexprimé	WT1	Oui	**CD8 CD137 et IVS+ICS**	CD8	T anti-WT-1 : 28/63 (44%)	Fréquence de réponses anti-WT1 plus elevée chez les hauts grades	Pas d'association avec la réponse clinique	Israyelyan et al., 2013
Glioblastome	Surexprimé	SOX2	Oui	**Prolifération CFSE + ELISA CXCL10**	CD8	T anti-SOX2 : 5/14 **(36%)**	Fréquence équivalente : 3/6 : bas grade vs 2/8 : haut grade	Non évalué	Vasquez et al., 2017
Gammopathie	Surexprimé	SOX2	Oui	**ICS**	CD4 et CD8, sans distinction	T anti-SOX2: 13/31 **(42%)**	Non évalué	Association favorable avec la survie	Spisek et al., 2003
Gammopathie monoclonale	Surexprimé	SOX2	Oui	**ICS**	CD4 et CD8, sans distinction	T anti-SOX2 : 142/287 **(49%)**	Non évalué	Association favorable avec la survie	Dhodapkar et al., 2015
Col de l'utérus	Viraux	HPV 16 E7	Oui	**ELISPOT IFNγ et ICS**	CD4	T anti-HPV : 9 /14 **(64%)**	Non évalué	Association favorable avec la régression des lésions	Peng S et al., 2007
Col de l'utérus	Viraux	HPV 16 E6 et E7	Oui	**ELISPOT IFNγ**	CD4 et CD8, sans distinction	T anti-HPV 16 E6 : 9/50 **(18%)** T anti-HPV16 E7 : 5/50 **(10%)**	Non évalué	Association favorable avec la survie	Trimble et al., 2010
Col de l'utérus haut grade	Viraux	HPV 18 E6	Oui	**ELISA IFNγ et prolifération**	CD4	T anti-HPV ELISA : 19/37 **(51%)** Prolifération :14/37 **(38%)**	Non évalué	Association favorable avec la survie	Seresini at al., 2007
Melanome et cancer du rein	Cancer/testis	MAGE-6	Oui	**ELISPOT IFNγ et IL5**	CD4	Réponse Th1 anti-MAGE-6 Mélanome : 6/18 **(33%)** Rein: 4/18 **(22%)**	Non évalué	Association favorable avec la survie	Tatsumi, et al., 2002

Table 8 (suite) : Liste des études associant la réponse T spécifiques d'antigènes de tumeurs mesurée dans le sang et les données cliniques de patients atteints de cancer

III. Rôles des lymphocytes T CD4 dans l'immunité anti-tumorale

La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative de type humorale ou cytotoxique est intimement liée à la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 et à leur différenciation.

Depuis la description des deux sous-populations Th1 et Th2 en 1989, (Mosmann and Coffman, 1989), on dénombre actuellement 7 sous-populations distinctes de T CD4, LTh1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg, TFH (follicular helper T cell).

Elles sont communément définies par leur production de cytokines mais également par l'expression de facteur de transcription et de récepteurs de chimiokines spécifiques (Figure 19). Ces sous-populations de CD4 sont caractérisées par une plasticité et une flexibilité de leur polarisation influencée par différents facteurs tels que l'environnement cytokinique, et une régulation épigénétique. En effet, à un stade précoce de différentiation, l'ensemble des LT CD4 peut être facilement redirigé vers un autre sous-type de polarisation. En revanche à un stade tardif de la différenciation, seuls les Th1 et les Th2 sont différenciés de façon terminale, les autres populations conservent encore leur plasticité (Zhu and Paul, 2008; Bluestone et al., 2009; DuPage and Bluestone, 2016).

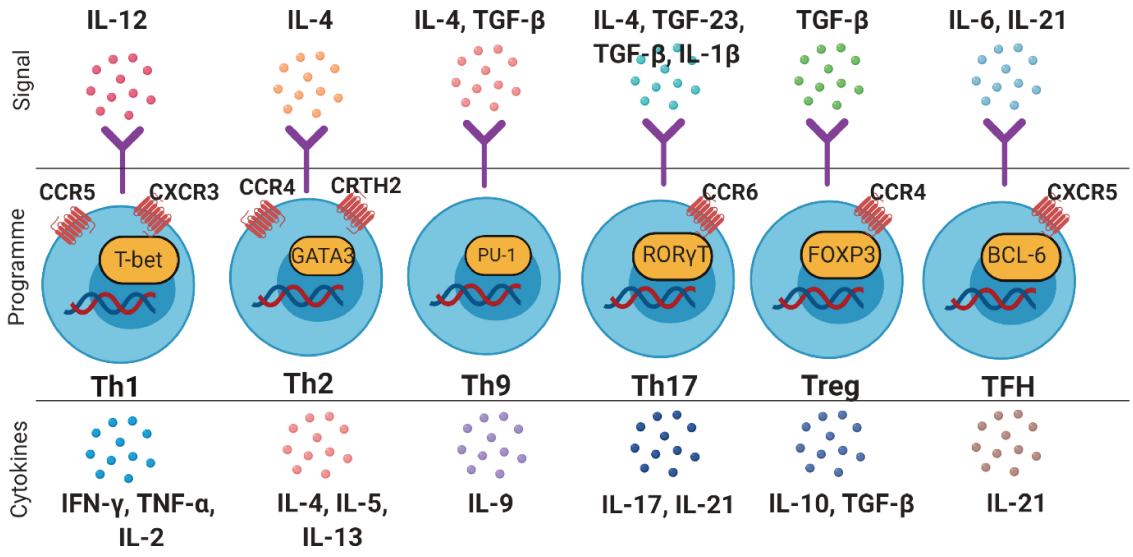


Figure 19 : Les différentes sous-populations de LT CD4 helper. Différents signaux de cytokines permettent leur différentiation en Th1, Th2, Th9, Th17, Treg ou TFH. Ces sous-populations sont caractérisées par l'expression de récepteurs de chimiokines, et des facteurs de transcription qui leur sont propres et vont leur permettre de produire certaines cytokines à leur tour. Adapté de Dupage 2016.

A. Lymphocytes T CD4 Th1 : un rôle anti-tumoral majeur

Au cours de cette dernière décennie, le rôle des lymphocytes T CD4 dans l'immunité anti tumorale a été clairement établi (Kennedy and Celis, 2008). Ainsi les différentes sous-populations de CD4 helper vont avoir différents rôles pro ou anti-tumoral par le biais de différents mécanismes.

Les CD4 Th1 produisent de grande quantité d'IFN-γ, de TNF-α et d'IL-2 et expriment le facteur de transcription T-bet. Les Th1 sont également caractérisés par l'expression de certains récepteurs aux chimiokines tels que CCR5 et CXCR3. L'IL-12 et l'IFN-γ sont deux cytokines importantes impliquées dans la différenciation Th1 (Kim and Cantor, 2014).

Le rôle anti-tumoral des lymphocytes Th1 a été bien établi depuis plusieurs années : ils orchestrent l'immunité à médiation cellulaire anti-tumorale. Leur rôle « helper » est le plus étudié, il porte sur la régulation des LT CD8, critique pour maintenir les fonctions des LT CD8 et les aider à augmenter la réponse anti-tumorale. Plusieurs mécanismes de help ont été décrits (Figure 20) :

- Les CD4 Th1 augmentent la présentation des antigènes et les capacités de costimulations des cellules dendritiques. Un signal clé est délivré par l'interaction entre le CD40 ligand (CD40L) exprimé transitoirement par le LT CD4 activé et le CD40 exprimé par la DC. Accompagné par la sécrétion d'IFN-γ et de GM-CSF, cela conduit à l'activation des DC, et à leur production de certaines cytokines comme l'IL-12 et l'IL-15 qui ont un rôle majeur dans la réponse CTL (Filatenkov et al., 2005; Greyer et al., 2016). Les DC ainsi stimulées, expriment le CD80 et/ ou CD86, ainsi que le CD70 qui par les voies respectives du CD28 et du CD27 sur le CTL fournissent un signal d'initiation du cycle cellulaire, de survie et de métabolisme et de différentiation des CD8 (Prilliman et al., 2002; Feau et al., 2012; van de Ven and Borst, 2015; Ahrends et al., 2016, 2017).
- Les CD4 Th1 permettent l'activation et la maturation des DC, assurant une présentation antigénique et une costimulation efficace pour les CTL, interaction appelée « le ménage à trois » (Ridge et al., 1998).

- Les CD4 Th1 helper peuvent augmenter le potentiel migratoire et invasif des CTL. L'interaction entre le CD4 Th1 activé, et la cellule dendritique induit la production de CCL3/4 qui attirent les CD8 exprimant CCR5 au site de l'interaction entre le CD4 et la DC (Castellino et al., 2006). Le CTL activé exprime à des niveaux importants les récepteurs de chimiokines comme le CXCR4 et CX_3CR1 qui soutiennent l'extravasion des CTL sur le site tumoral (Ahrends et al., 2017). Cette fonction est soutenue par la production d'IFN-γ par les Th1 qui favorise l'expression des molécules du CMH par les cellules tumorales conduisant à une

reconnaissance accrue de ces cellules par les lymphocytes T (CTL et Th1). De plus, il induit la sécrétion de chimioattractants (ex : CXCL9, CXCL10, CCL5…) par les cellules épithéliales tumorales et les cellules endothéliales qui vont pouvoir attirer les CTL spécifiques de la tumeur sur le site de l'inflammation (Nakanishi et al., 2009; Bos and Sherman, 2010).

- Les CD4 Th1 helper peuvent augmenter l'activité des CTL. Les CTL aidés par les CD4 expriment davantage de molécules effectrices comme le TNF-α, le granzyme B, et l'IFN-γ et de plus faibles taux de récepteurs inhibiteurs comme PD-1 et TIM-3 (Ahrends et al., 2017).

- Les CD4 Th1 helper peuvent augmenter la mémoire, la différenciation et la survie des CTL effecteurs. Après le priming, les CTL se différencient en plusieurs types de cellules effectrices, dont des T effecteurs qui ont demi-vie très courte, et des T mémoires persistants. Le rôle helper des LT CD4 affecte l'expression de plusieurs facteurs de transcription incluant les gènes régulateurs impliqués dans la différentiation des CTL, telles que EOMES, t-bet, et ID3 impliqués également dans la régulation des modifications épigénétiques permettant d'optimiser la longévité et les fonctions mémoires des CTL (Kaech and Cui, 2012; Weng et al., 2012; Gray et al., 2014; Laidlaw et al., 2016). De plus, les CD8 activés surexpriment l'IL-2 et l'IL-2Rα, supportant leur différenciation, survie et métabolisme (Williams et al., 2006). L'IL-2 est montrée indispensable à l'expansion secondaire des CTL mémoires (Janssen et al., 2005). Très récemment le groupe de Schreiber a montré que les LT CD4 augmentaient à la fois le priming des CD8 spécifiques de la tumeur et la maturation des CD8 en CTL spécifiques sur le site de la tumeur. Dans des modèles de souris exprimant des tumeurs de sarcome non reconnues par le système immunitaire, les auteurs ont élaboré un système permettant à ces tumeurs d'exprimer une mutation dans l'intégrine β1 comme un néoantigène de CMH II majeur ou un néoantigène de CMH I. Les auteurs ont aussi mis en avant le fait que la tumeur devait exprimer des néoantigènes reconnus à la fois par les CD4 et les CD8 pour induire une réponse favorable aux immunothérapies (Alspach et al., 2019).

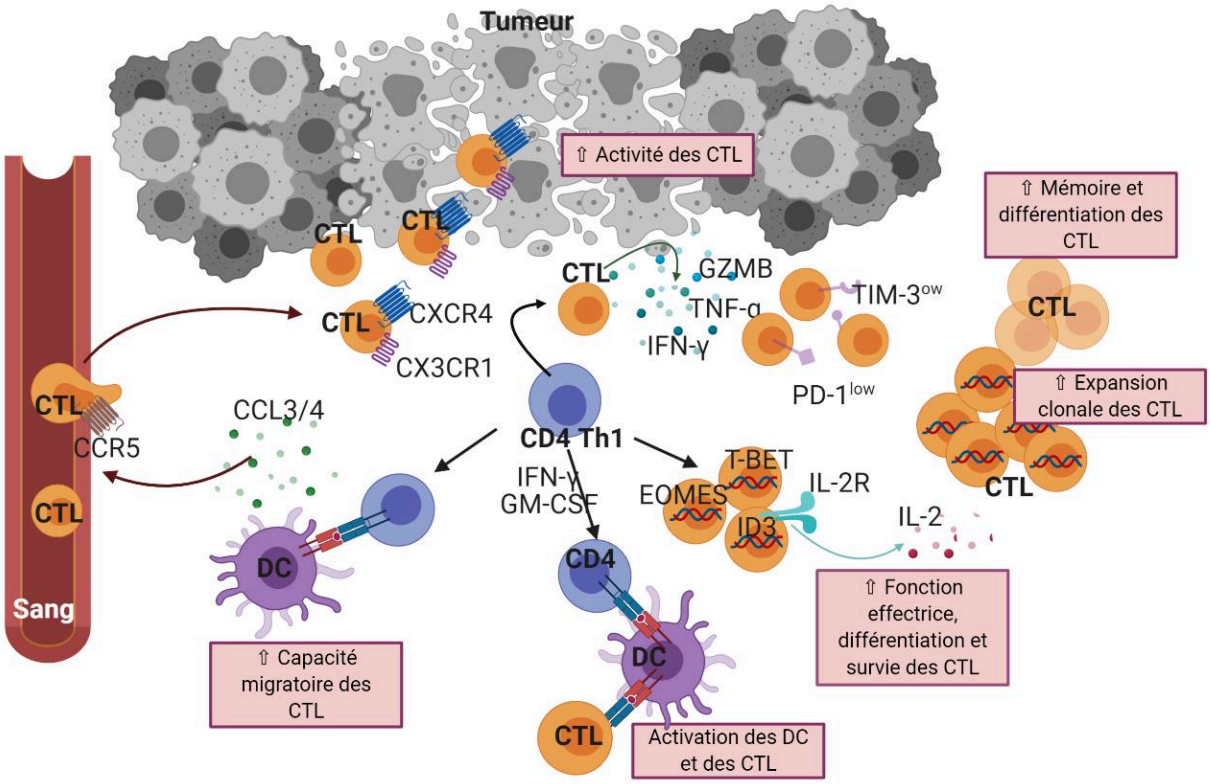


Figure 20 : Rôle helper des CD4 Th1 sur les CTL. Différents mécanismes permettent au CD4 Th1 d'exercer un rôle de help sur les CD8. Adapté de (Borst et al., 2018).

Autres fonctions

Les CD4 Th1 sont capables d'acquérir un phénotype cytotoxique et de médier la lyse des cellules tumorales en absence de LT CD8 spécifiques de la tumeur. Les CD4 peuvent reconnaitre directement l'antigène sur la cellule tumorale dans le cas où elles expriment le CMH de classe II. Leur action cytotoxique s'exerce par le biais de la sécrétion de cytokines telles que le TNF-α ou en provoquant l'apoptose des cellules tumorales via les voies de Fas/FasL ou TRAIL (TNF-related apotosis-inducing ligand) (Zanetti, 2015). L'IFN-γ produit par les CD4 peut aussi agir directement sur les cellules tumorales causant leur sénescence via un mécanisme dépendant de STAT1 et TNFR1 (Bos and Sherman, 2010; Braumüller et al., 2013; Matsuzaki et al., 2015). Récemment, il a aussi été rapporté que les LT CD4 détectent spontanément des mutations somatiques des cellules cancéreuses et favorisent le rejet de la tumeur (Tran et al., 2014; Kreiter et al., 2015; Linnemann et al., 2015). L'IFN-γ produit par les Th1 induit la production de NO et de ROS par les macrophages impliqués dans l'élimination des cellules tumorales. Via la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-2, les Th1 participent à l'activation des cellules NK.

Les LT CD4 auraient également un rôle dans la vascularisation des tumeurs (De Palma and Jain, 2017; Tian et al., 2017) (Figure 21).

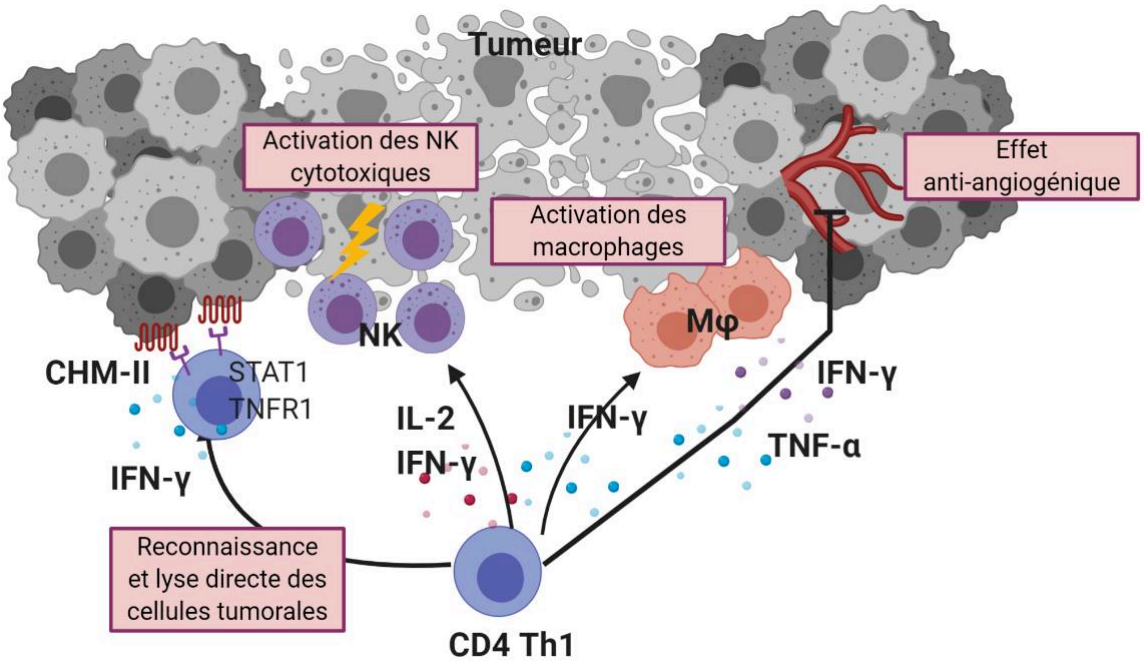


Figure 21 : Rôle anti-tumoral des CD4 Th1. Outre ses rôles helper, les CD4 Th1, via leur sécrétion de cytokines ont d'autres fonctions anti-tumorales au niveau de l'activation des NK, des macrophages, un effet anti-angiogénique et une reconnaissance directe des cellules tumorales.

Valeur pronostique des CD4 Th1

Étant donné l'importance du rôle de ces cellules dans la contribution de la réponse anti-tumorale, un infiltrat immunitaire de type Th1 dans la tumeur est associé à un pronostique favorable des patients atteints de cancer. Cela concerne de nombreux types de cancers incluant le mélanome, cancer du sein, cancer colorectal, ovaire, œsophage, rein, poumon, foie, estomac (Fridman et al., 2012) (Figure 22).

Bien que la plupart des cellules tumorales n'expriment pas le CMH de classe II, l'expression des molécules HLA-DR sur les cellules tumorales a été retrouvée associée à un bon pronostique chez les patients atteints de cancers (Sconocchia et al., 2014) suggérant un effet bénéfique de la reconnaissance directe des cellules tumorales par les CD4 Th1.

Il a également été montré dans les cancers du côlon, que le profil d'infiltration tumoral CD8+CD45RO+ était associé à une orientation immunitaire des LT CD4 de type Th1 (Pagès et al., 2009).

L'impact pronostique des LT CD4 Th1 a également été étudié après traitement par immunothérapie. Les CD4 circulants sont retrouvés augmentés chez les patients répondeurs à l'immunothérapie (Spitzer et al., 2017) et la présence de CD4 fonctionnels très différenciés n'exprimant pas le CD28 est associée aux taux de réponse objective des patients atteints de cancer du poumon et traités par anti-PD1/PD-L1 (Zuazo et al., 2019). Par ailleurs, il a été montré que la restauration de l'efficacité des immunothérapies par le microbiote intestinal est dépendante des CD4 Th1 (Pitt et al., 2016; Routy et al., 2018).

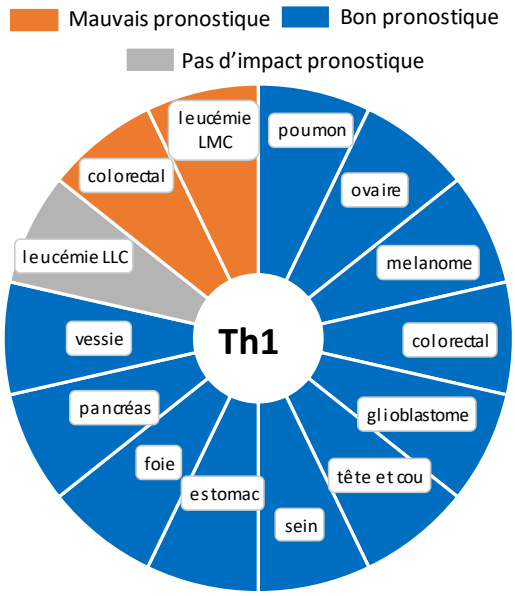


Figure 22 : Association entre la présence de LTh1 intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers. Inspiré de (Chraa et al., 2019; Galon and Bruni, 2020).

B. Lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 sécrètent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et expriment le facteur de transcription GATA3 ainsi que les récepteurs de chimiokines CCR4, CRTH2. Les T CD4 naïfs se polarisent en Th2 sous l'influence de l'IL-2 et de l'IL-4 (Zhu et al., 2010; Walker and McKenzie, 2018). Leur rôle dans les cancers est mixte, de nature pro ou anti-tumoral selon le type de cancer (Figure 23). Les cytokines Th2 sont souvent associées à une suppression des réponses immunitaires anti-tumorales (Walker and McKenzie, 2018). Dans certains cancers comme le cancer du rein, de l'ovaire, de l'estomac, pancréas, et le glioblastome, la présence d'un environnement cytokinique Th2 est associée à un mauvais pronostique (Tatsumi et al., 2002; Kusuda et al., 2005; Ubukata et al., 2010; Ochi et al., 2012; Shimato et al., 2012).

A l'inverse, un rôle anti-tumoral a été rapporté dans les lymphomes, cancers du sein, et cancer colorectal (Schreck et al., 2009; Yoon et al., 2010; Tosolini et al., 2011). Ce rôle anti-tumoral est attribué à l'IL-4, à travers le recrutement d'éosinophiles et macrophages infiltrant la tumeur (Tepper et al., 1992).

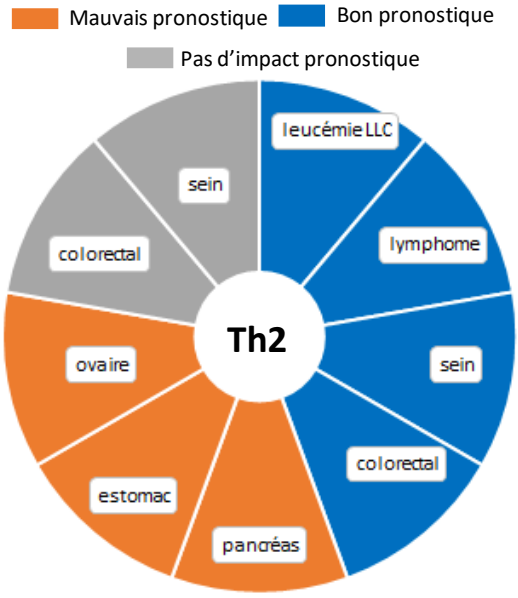


Figure 23 : Association entre la présence de LTh2 intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers.
Inspiré de (Chraa et al., 2019; Galon and Bruni, 2020)

C. Lymphocytes Th17

Les CD4 Th17 produisent de l'IL-17A et de l'IL-22, et sont caractérisés par l'expression de ROR-γT (Receptor-related Orphan Receptor gamma-T) et du récepteur aux chimiokines, CCR6. L'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et le TGF-β sont les cytokines indispensables à la différentiation et au maintien de la polarisation Th17 (Zou and Restifo, 2010). Bien que le rôle des Th17 varie d'un type de modèle à l'autre ou en fonction du type de cancer, ces cellules ont généralement un rôle pro-tumoral (Bailey et al., 2014; Asadzadeh et al., 2017) (Figure 24). Ainsi les cellules Th17 stimulent le recrutement de macrophages en M2 et des LT régulateurs au sein de la tumeur favorisant ainsi la progression tumorale et les métastases (Knochelmann et al., 2018). D'un autre côté, des fonctions anti-tumorales ont pu être attribuées aux Th17, notamment via le recrutement des neutrophiles, des cellules NK, des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral (Asadzadeh et al., 2017). Cependant, le bon pronostique de ces LTh17 n'a été montré que chez peu de cancers (cancer gynécologiques) (Chraa et al., 2019).

Ce rôle ambivalent des Th17 peut être expliqué par la grande plasticité de ces lymphocytes qui peuvent être convertis en Th1 ou Tregs (Asadzadeh et al., 2017; Knochelmann et al., 2018).

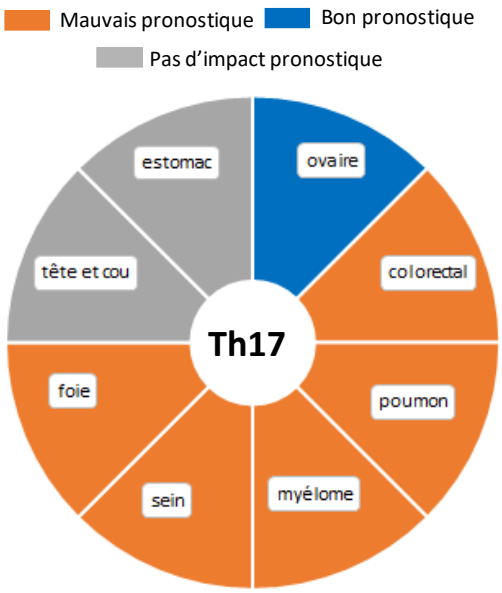


Figure 24 : Association entre la présence de LTh17 intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers. Inspiré de (Chraa et al., 2019; Galon and Bruni, 2020)

D. Lymphocytes Th9

Ils sont caractérisés par la production d'IL-9 mais également d'IL-10 et d'IL-21. Décrits en 2008, comme un sous-type de lymphocytes Th2 capable de se différencier en Th9 en présence des cytokines IL-4 et TGF-β (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Leur différenciation implique les facteurs de transcription PU.1, IRF4 et STAT6. Initialement, les lymphocytes Th9 étaient décrits comme pro-inflammatoires et ayant un rôle dans les maladies auto-immunes et les allergies. Ce n'est que récemment que des études ont pu mettre en évidence l'implication de l'IL-9 et des Th9 dans l'immunité anti-tumorale (Purwar et al., 2012; Schmitt and Bopp, 2012; Végran et al., 2014). Même si leur rôle n'est pas encore véritablement établi dans les cancers, il semblerait que le rôle anti-tumoral des lymphocytes Th9 repose sur leur capacité à recruter les LT CD8+ et les cellules dendritiques (Purwar et al., 2012). Cependant, un rôle pro-tumoral a été décrit dans le cancer du foie où les patients avec un fort infiltrat de cellules Th9 présentaient une moins bonne survie (Tan et al., 2017) (Figure 25).

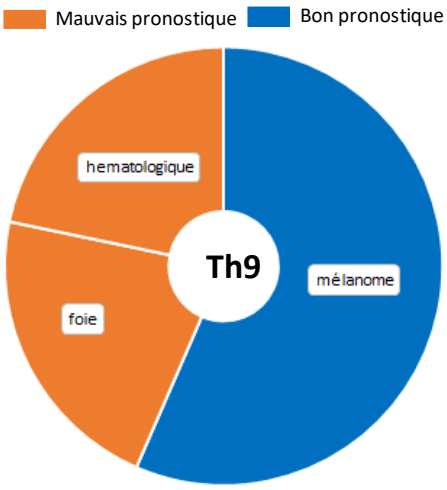


Figure 25 : Association entre la présence de LTh9 intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers. Inspiré de (Chraa et al., 2019; Galon and Bruni, 2020)

E. Lymphocytes T helper follicullaire

Les lymphocytes T helper folliculaire (TFH) sont polarisés par les cytokines IL-6 et IL-21 et expriment le facteur de transcription bcl-6 (Nurieva et al., 2008; Tangye et al., 2013). Ils expriment le récepteur CXCR5 qui leur permet d'être maintenus au niveau des follicules lymphoïdes B et de participer à la différentiation et à la maturation des lymphocytes B via la sécrétion d'IL-4 et d'IL-21. Le rôle des lymphocytes TFH dans le cancer est encore mal connu. Cependant, deux études ont montré qu'ils étaient associés à un bon pronostic dans les cancers du côlon et du sein (Bindea et al., 2013; Gu-Trantien et al., 2013).

F. Lymphocytes T CD4 régulateurs

Les lymphocytes Tregs ont été découverts en 1995 par S Sakaguchi, ils sont impliqués dans les phénomènes de maintien de la tolérance, d'auto-immunité et de contrôle de la réponse immunitaire (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009; Sakaguchi et al., 2011). Ils expriment de façon constitutive le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead boxP3*) et sont caractérisés par une forte expression de CD25 (chaine alpha du récepteur à l'IL-2) et une faible expression de CD127.

Les Tregs peuvent être recrutés au sein de la tumeur via CCL22 produit par les cellules cancéreuses et les DC, lequel se lie au CCR4 fortement exprimé par les Tregs (Gobert et al., 2009; Halim et al., 2017). Une fois dans la tumeur, les Tregs exercent leur rôle

immunosuppresseur dirigé contre les lymphocytes T et les autres cellules effectrices. Plusieurs mécanismes suppresseurs contact cellulaire-dépendants, ou via la production de cytokines inhibitrices ou encore à travers la perturbation métabolique sont décrits (Figure 26).

L'inhibition par contact cellulaire implique différents récepteurs de surface exprimés par les Tregs et impliqués dans leurs fonctions tels que : le CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), GITR (glucocorticoidinduced tumor necrosis factor family related gene), LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009; Pere et al., 2012). Les ligands de ces récepteurs sont exprimés par les cellules effectrices du TME et leur interaction est à l'origine de signaux inhibiteurs. C'est notamment le cas pour CTLA-4 qui se lie aux CD80/CD86 ou LAG-3 qui se lie au CHM-II (Park et al., 2018; Huang et al., 2004).

De plus, les ecto-enzymes CD73 et CD39 exprimées à la surface des Tregs catalysent la dégradation de l'ATP en adénosine qui inhibe les T effecteurs et les DC (Ernst et al., 2010).

Les Tregs inhibent également les réponses immunitaires anti-tumorales via la production d'IL-10, TGF-β, et IL-35 et peuvent exercer une action cytotoxique directe via le granzyme B et la perforine.

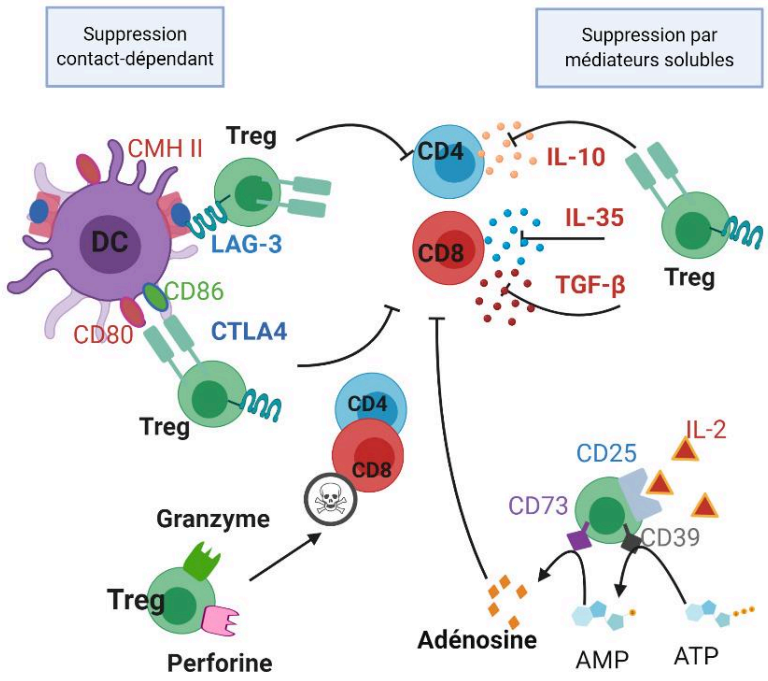


Figure 26 : Rôle suppressif des LT régulateurs. Les Tregs exercent leur rôle pro-tumoral via deux grands mécanismes suppressifs, l'un contact dépendant et l'autre via des médiateurs solubles.

En clinique, des études montrent une association favorable entre une infiltration riche en Tregs et le bon pronostique des patients (Tosolini et al., 2011), tandis que d'autres montrent une association défavorable (Adeegbe and Nishikawa, 2013; Whiteside et al., 2012) ou les deux (Figure 27). Néanmoins, une récente méta-analyse de 17 types de cancers, a montré qu'une fréquence importante de Tregs dans les tumeurs était associée à un mauvais pronostique des patients, quel que soit le type de tumeur (Shang et al., 2015).

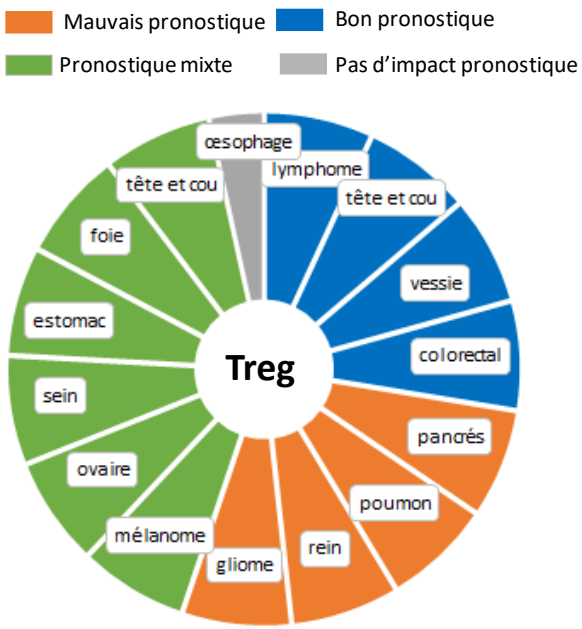


Figure 27 : Association entre la présence de LTregs intra tumoraux et le pronostique des patients atteints de différents cancers. Inspiré de (Chraa et al., 2019; Galon and Bruni, 2020)

IV. La télomérase

A. La télomérase : enzyme responsable de l'immortalisation des cellules cancéreuses

La télomérase est une reverse transcriptase qui intervient dans le maintien des télomères par la synthèse de séquence 5'TTAGGG-3' à l'extrémité des chromosomes. La télomérase a été découverte en 1984 par Carol Greider et Elizabeth Blackburn qui ont reçu le prix Nobel en 2009 (Greider and Blackburn, 1985). Cette enzyme est un complexe ribonucléoprotéique constitué de 2 composants essentiels : une sous-unité catalytique appelée télomérase reverse transcriptase (TERT) dont le rôle majeur est la polymérisation des nucléotides et d'un ARN hTR (human Telomerase RNA component), ce dernier servant de matrice lors de l'extension des télomères. Ensemble, ces deux composants constituent l'activité de la télomérase reverse transcriptase (Figure 28A)(Artandi and DePinho, 2010; Martínez and Blasco, 2011).

La cellule cancéreuse utilise ce mécanisme en surexprimant la télomérase afin d'échapper à la sénescence engendrée par un raccourcissement des télomères des cellules somatiques en division, la télomérase se retrouve au cœur du processus d'immortalisation cellulaire, caractéristique propre aux cellules cancéreuses et aux cellules souches (Kim et al., 1994; Shay, 2016) (Figure 28B).

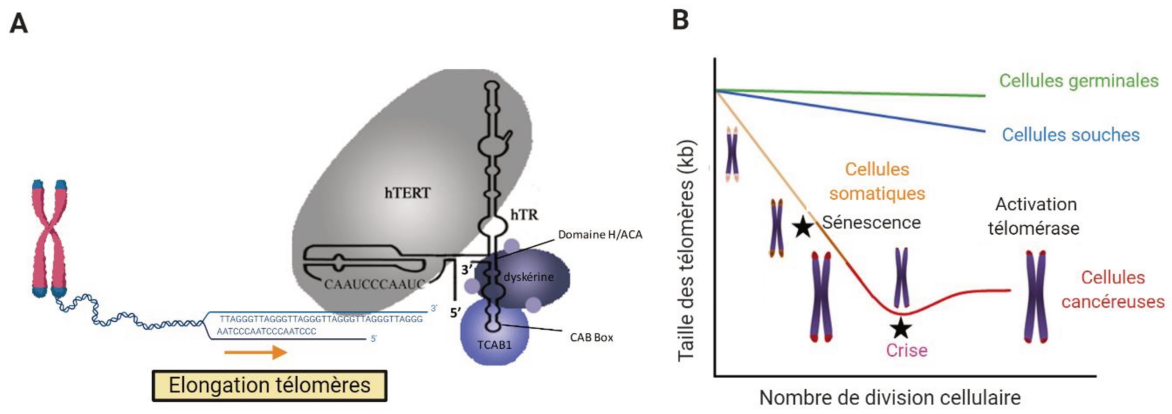


Figure 28 : Structure de la télomerase et horloge télomérique. **A**, Structure du complexe télomerase composée de deux sous-unités, une matrice ARN hTR nécessaire à l'élongation des télomères et une sous-unité catalytique à transcriptase inverse. **B**, Modèle de l'horloge télomérique avec perte progressive des telomères au cours des divisions, vieillissement des cellules, crise et mort par sénescence et d'autre part, activation de la télomérase et immortalité cellulaire.

B. Rôle de la télomérase dans l'oncogenèse

Outre son rôle canonique d'allongement télomérique, la télomérase possède d'autres fonctions oncogéniques télomères-indépendantes, telle que la régulation d'expression de gènes, la prolifération, l'apoptose (Low and Tergaonkar, 2013; Li and Tergaonkar, 2014; Shay, 2016).

Parmi ces différents rôles, certains sont directement lié à la régulation de la transcription de facteurs oncogéniques tels que, Myc, NF-kB, Wnt/ β-cathenine (Choi et al., 2008; Park et al., 2009). En effet, il a été montré que TERT en se liant à la sous-unité p65 de NF-KB dans le noyau entraine la transcription des gènes impliqués dans l'inflammation tels que IL-6, TNF-α et IL-8 jouant ainsi un rôle critique dans la progression tumorale (Ghosh et al., 2012). Un mécanisme similaire a été décrit pour la transcription des gènes de la voie Wnt/ β-cathenine. De façon intéressante, ces facteurs oncogéniques de transcription Myc (Wu et al., 1999), NF-kB (Yin et al., 2000) et β-cathenine (Hoffmeyer et al., 2012) participent à la réactivation de la télomérase. Il existe donc une boucle de rétro-activation entre ces oncogènes permettant leur amplification de manière autonome (Low and Tergaonkar, 2013). La transcription de ces gènes oncogéniques peut stimuler la prolifération cellulaire, contrecarrer la différentiation, favoriser l'invasion et les métastases via la promotion de l'EMT et réguler l'inflammation chronique et l'immunosuppression (Choi et al., 2008; Liu et al., 2013).

Il a été également, observé que TERT entraînait une expression accrue de gènes comme la cycline D, la cycline A2 ou les protéines E2F1, propice au déclenchement de signaux de prolifération (Mukherjee et al., 2011). De même, une régulation positive des gènes EGFR (Epidermal Growth Factor Recepor) ou FGF (Fibroblast Growth Factor) stimulant la division cellulaire accompagne la surexpression de TERT (Jin et al., 2010b; Mukherjee et al., 2011). Parallèlement, TERT protège les cellules de l'apoptose via l'inhibition de TRAIL (TNF-apoptosis induction signal) et de la voie classique de mort cellulaire p53 dépendante (Jin et al., 2010b; Listerman et al., 2013). Le rôle de TERT a également été montré dans la promotion de l'angiogenèse tumorale, où TERT régule positivement l'expression du VEGF par des interactions directes avec le gène Vegf et le facteur de transcription Sp1 (Liu et al., 2020).

L'ensemble de ces fonctions témoignent des propriétés oncogéniques de cette enzyme, la hissant au rang des caractéristiques (ou hallmarks) du cancer décrite par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 29).

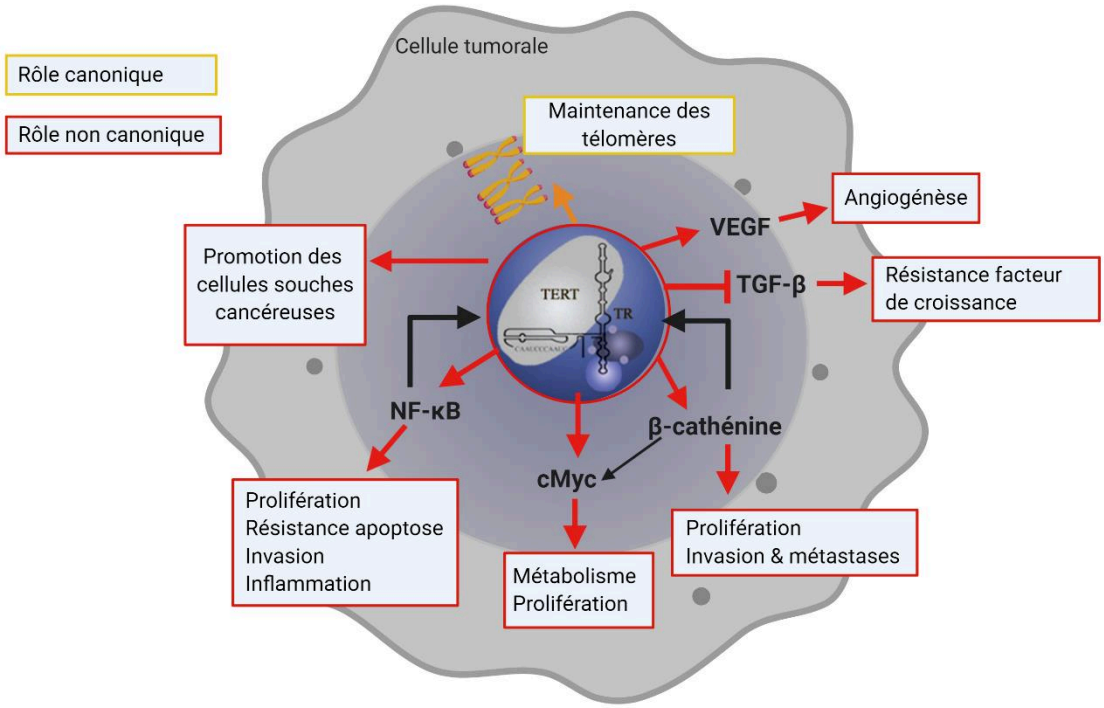


Figure 29 : Fonctions de la télomérase. Le premier rôle de la télomérase est son rôle canonique qu'elle assure au niveau du maintien et de l'allongement des télomères. D'autres fonctions non canoniques lui sont attribuées qu'elle exerce via la transcription de ses gènes cibles : NF-κB, cMyc, β-cathénine et VEGF. Plus récemment, son rôle au niveau de la promotion des fonctions des cellules souches cancéreuses a été décrit. Inspiré de (Low and Tergaonkar, 2013).

Étant donné le rôle essentiel de la télomérase dans la survie des cellules, son expression est régulée à différents niveaux et par plusieurs mécanismes. La réactivation de la télomérase dans les cellules cancéreuses est en grande partie la conséquence de la réexpression du gène d'hTERT, et de sa régulation transcriptionnelle constituant un mécanisme critique dans l'établissement de la tumorigénèse (Martínez and Blasco, 2011). Bien que cette régulation complexe ne soit pas encore totalement élucidée, plusieurs mécanismes ont été décrits à différents niveaux : amplification génique, mutation/délétion du promoteur, régulation épigénétique, régulation post transcriptionnelle (épissage alternatif), modifications post-traductionnelles (Kyo and Inoue, 2002). Le mécanisme le plus important étant la régulation du promoteur de TERT. En effet, il contient de nombreuses séquences consensus comprenant des sites de fixations de facteurs de transcription qui peuvent être soit activateurs, E6 du papillomavirus (Park et al., 2001), Wnt/b-catenine (Hoffmeyer et al., 2012), soit inhibiteurs, p53 (Yao et al., 2012) ou les deux, c-myc (Klingelhutz et al., 1996).

Récemment, plusieurs mutations du promoteur ont été décrites dans de nombreux cancers (Min and Shay, 2016). Elles sont retrouvées en nombre très fréquent dans le mélanome (~85%), glioblastome (~84%), carcinome hépatocellulaire (~44%), liposarcomes (~79%), et cancers urothéliaux (~47%) (Vinagre et al., 2013; Heidenreich et al., 2014; Romaniuk et al.,

2019) (Figure 30). La mutation du promoteur de TERT est souvent associée à une forte expression ou activité de la télomérase (Lötsch et al., 2013; Huang et al., 2015a) et est associée à un mauvais pronostique des patients (Killela et al., 2013; Eckel-Passow et al., 2015; Melton et al., 2015; Borah et al., 2015). Une étude récente montre que les mutations de TERT et l'hyperméthylation de la région THOR sont associées à un surexpression de TERT et à une augmentation du risque de cancer de la vessie (Leão et al., 2019).

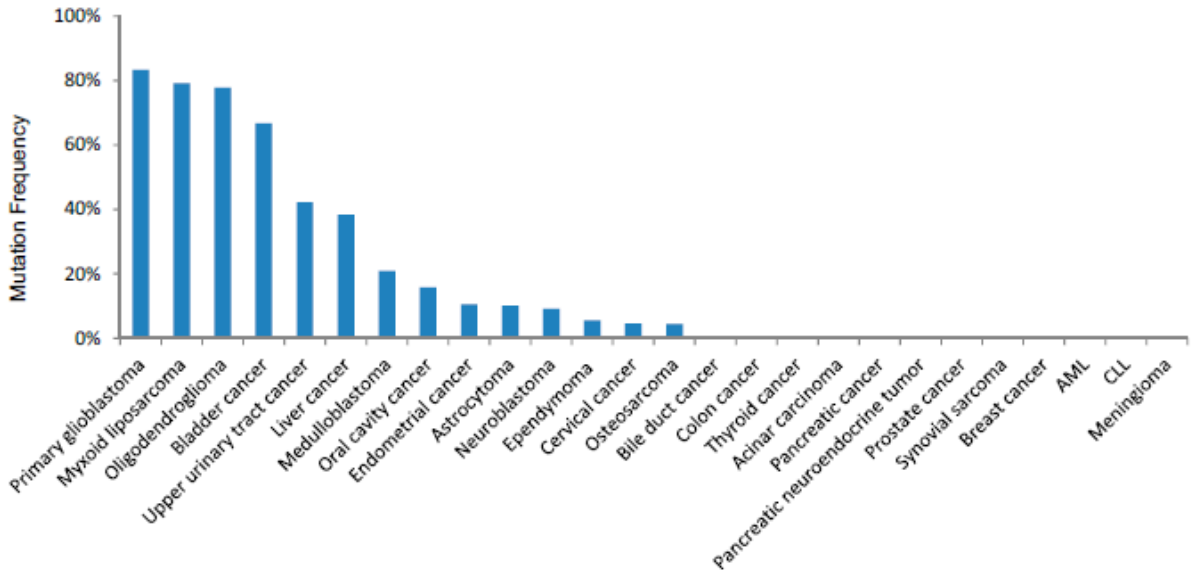


Figure 30 : Fréquence des mutations du promoteur de TERT dans différents cancers. Issue de (Killela et al., 2013).

C. La télomérase : un antigène surexprimé dans la majorité des cancers

L'implication de la télomérase dans le développement de tumeurs a été mise en évidence en 2000, les auteurs ont pu montrer que des souris transgéniques 'knockout' pour le gène TERT présentaient un nombre réduit de tumeurs cutanées comparé à des souris normales et à des souris dont le gène TERT était surexprimé (González-Suárez et al., 2000; Artandi and DePinho, 2010). On sait depuis plusieurs années maintenant que la télomérase est surexprimée dans 80 à 90% des cancers (Shay and Bacchetti, 1997). La télomérase permet donc à la majorité des cancers humains de maintenir la longueur de leur télomère fournissant ainsi aux cellules cancéreuses un potentiel prolifératif illimité. De plus, la télomérase est retrouvée exprimée à chaque stade de l'évolution de la tumeur, avec une expression visible dès la cellule souche cancéreuse et se poursuivant dans les métastases (Shay, 2016). Récemment, des études ont démontré que les cellules souches cancéreuses expriment des niveaux plus élevés de TERT, qui peuvent réguler plusieurs fonctions cellulaires telle que la

pluripotence, la prolifération, l'invasion, l'expression des gènes et la résistance aux traitements (Teralı and Yilmazer, 2016; Liu et al., 2020). Plusieurs preuves mettent en évidence que la surexpression de la télomèrase par les cellules souches cancéreuses est un important mécanisme via lequel ces cellules acquièrent une durée de vie indéfinie et à l'origine de la propagation des tumeurs (Clarke et al., 2006; Liu et al., 2013). Il a été rapporté que la surexpression de TERT pouvait favoriser le caractère souche des cellules souches cancéreuses gastriques, alors que son inhibition le supprimait. L'utilisation de siRNA de TERT dans les cellules souches cancéreuses gastriques a montré l'inhibition du marqueur OCT-4, bien connu pour son expression dans les cellules souches, suggérant que TERT a le potentiel de maintenir la pluripotence des cellules souches cancéreuses (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2017). En revanche, l'expression de TERT dans les cellules normales est quasiment inexistante (Shay, 2016).

Les travaux pionniers de l'équipe de Vonderheide et al. ont montré que TERT pouvait être une cible antigénique reconnue par les CTL (Vonderheide et al., 1999). Par la suite plusieurs travaux ont décrit des épitopes immunogènes de classe I et de classe II dérivés de TERT (Beatty and Vonderheide, 2008; Harley, 2008; Zanetti, 2017). Compte tenu de sa fonction et de son expression quasi universelle dans les cancers, la télomérase représente une cible de choix pour les traitements anticancéreux et l'immunothérapie (Zanetti, 2017; Mizukoshi and Kaneko, 2019; Saraswati et al., 2019).

Rationnel et Objectifs

Plusieurs évidences démontrent le rôle central de l'immunité adaptative T dans la réponse immunitaire anti-tumorale (Koebel et al., 2007; Vesely et al., 2011). En témoignent, les nombreux mécanismes d'échappement développés par les tumeurs pour échapper aux cellules T ainsi que le succès des immunothérapies ciblant les voies de résistances à l'attaque immunologique comme les inhibiteurs de checkpoints (Chen and Mellman, 2013; Ribas and Wolchok, 2018). La théorie de l'immunoédition décrit la réponse immunitaire comme un processus dynamique et évolutif (Dunn et al., 2004). Ainsi la réponse T anti-tumorale doit être vue comme un processus dynamique selon le modèle proposé par Chen & Mellmann (Chen and Mellman, 2013, 2017). Dans ce processus multi-étapes, le compartiment sanguin constitue le carrefour de passage des lymphocytes T anti-tumoraux migrant vers le lit tumoral et les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi l'utilisation du compartiment sanguin pour évaluer le statut immunitaire anti-tumoral chez un patient mérite donc d'être mieux considéré. Si le rôle des LT CD8 dans l'élimination des cancers est incontestable et représente à ce jour le « gold standard » pour évaluer la réaction de l'hôte contre sa tumeur, plusieurs évidences scientifiques soulignent un rôle fondamental des LT CD4 dans l'immunosurveillance des cancers (Kim and Cantor, 2014; Borst et al., 2018). En effet, plusieurs sous-populations de LT CD4 helper sont décrites et jouent différents rôles pro ou anti-tumoraux dans les cancers. De plus, la plasticité de certaines sous-populations de T CD4 a rendu plus complexe la compréhension de leur rôle dans les cancers par comparaison aux LT CD8 qui sont des cellules tueuses par excellence. Comme souligné précédemment, le rôle anti-tumoral de la sous-population CD4 Th1 est clairement établi depuis plusieurs années. Plus important, ces cellules sont capables de contrôler l'action des cellules effectrices et en particulier celles des LT CD8 anti-tumoraux (Kennedy and Celis, 2008; Ahrends et al., 2017; Zander et al., 2019). Ainsi, nous formulons l'hypothèse qu'une signature CD4 Th1 anti-tumorale donnerait une vision plus complète de l'immunité à médiation cellulaire dirigée contre la tumeur.

Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse à l'étude des réponses T CD4 anti-tumorales circulantes. Pour cela, l'équipe a développé une approche originale basée sur l'utilisation de peptides dégénérés dérivés de la télomérase et reconnu spécifiquement par les lymphocytes CD4 Th1.

Les travaux précédents de l'équipe de recherche

Depuis plusieurs années, notre équipe de recherche a mis en place un programme de recherche portant sur l'indentification de peptides restreints HLA de classe II dérivés d'antigènes de tumeur dans le but d'analyser les réponses T CD4 circulantes chez les patients et de développer des stratégies d'immunothérapie anti-tumorale (Adotevi Human Vacc 2013, Galaine Vaccine 2016). Les premiers travaux ont porté sur l'identification d'épitopes immunogènes restreints HLA de classe II dérivé de la télomérase (TERT) capables de cibler

les lymphocytes CD4 Th1 (Dosset et al., 2012; Godet et al., 2012a, 2012b; Laheurte et al., 2016).

L'équipe a donc tout d'abord, par une approche d'immunologie inverse, identifié 4 peptides pan HLA-DR issus de TERT. Ces peptides appelés « UCP » pour Universal Cancer Peptides ont été sélectionnés pour lier efficacement les allèles HLA-DR les plus exprimés dans la population tels que DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR15, DRB3… couvrant environ 80% de la population caucasienne (Godet et al., 2012a). Les LT CD4 anti-UCP sont caractérisés par leur production d'IFN-γ, TNF-α, et IL-2 correspondants à une polarisation Th1. En utilisant ces peptides dans un test ELISpot, les auteurs ont montré dans une cohorte de 84 patients atteints de cancer bronchique métastatique la présence dans le sang périphérique, de réponses spontanées T CD4 anti-UCP chez 38% des patients.
Une corrélation entre la présence de cette réponse systémique Th1 anti-UCP avant traitement et la survie des patients répondeurs à une chimiothérapie à base de sels de platine a également pu être rapportée dans ce travail (Godet et al., 2012a, 2012b).
Ces premiers travaux ont suscité un réel intérêt d'utiliser cette approche pour le suivi des réponses CD4 Th1 anti-tumorales chez les patients atteints de cancer.

Afin d'élargir cette approche à une majorité de patients et à d'autres cancers, une deuxième étude a permis de caractériser des nouveaux épitopes restreints HLA-DP4, allèle de classe II exprimé par environ 70% de la population caucasienne (Laheurte et al., 2016, Annexe 3). Les résultats de ces travaux ont permis de décrire 4 peptides immunogènes dérivés de TERT capables de stimuler des réponses Th1 anti-TERT restreintes HLA-DP4. En utilisant un test ELISpot IFN-γ, des réponses spontanées dirigées contre ces peptides ont été détectées dans le sang périphérique de patients atteints de différents cancers. Ce travail a également permis de montrer que les réponses Th1 anti-TERT restreintes HLA-DR sont plus immunogènes que celles restreintes HLA-DP4 (Laheurte et al., 2016). Néanmoins, l'ajout de ces 4 nouveaux peptides restreints HLA-DP4 aux 4 autres HLA-DR permettrait une couverture théorique encore plus large d'environ 90% de la population minimisant ainsi la contrainte liée à la restriction HLA (Table 9).

Epitope	Sequence	Restriction HLA
UCP1	PAAFRALVAQCLVCV	HLA-DR
UCP2	KSVWSKLQSIGIRQH	HLA-DR
UCP3	GTAFVQMPAHGLFPW	HLA-DR
UCP4	SLCYSILKAKNAGMS	HLA-DR
541-555	LAKFLHWLMSVYVVE	HLA-DP4
573-584	LFFYRKSVWSKLQSI	HLA-DP4
911-925	DEALGGTAFVQMPAH	HLA-DP4
613-627	RPALLTSRLRFIPKP	HLA-DP4

Table 9 : Séquences des 8 peptides TERT retreints HLA-DR et HLA-DP4 identifiés dans le laboratoire. (Godet et al., 2012b, Laheurte et al., 2016)

L'ensemble de ces résultats démontre que des LT spécifiques de ces peptides TERT sont présents dans le répertoire T périphérique des patients atteints de cancers et suggèrent également que ces peptides seraient naturellement apprêtés et présentés au LT CD4 *in vivo*. Ce dernier point a été exploré par les travaux de Galaine et al. en 2016. L'étude a permis de décrire les principales voies d'apprêtements et de présentation de TERT par le CMH-II. Ainsi les résultats ont démontré que la présentation de TERT par les molécules de CMH classe II utilisent la voie classique endo-lysosomiale mais aussi une voie non classique cytosolique. De plus, il a été montré qu'après sa libération par les cellules tumorales, l'internalisation de TERT dans les voies de présentation de classe II nécessitent les héparanes sulfates protéoglycanes (Galaine et al., 2016).

Parallèlement, l'immunogénicité des UCP a été évaluée *in vivo* dans un modèle de tumeur chez des souris transgéniques HLA. Ainsi les travaux de Dosset et al. ont montré la capacité de ces peptides à stimuler des réponses CD4 Th1 de forte affinité et démontré les principaux mécanismes impliqués dans le rôle « helper » des T CD4 anti-UCP (Dosset et al., 2012, 2013).

Objectifs de thèse

Ces travaux précédents ont posé une base solide pour l'utilisation des épitopes pan HLA-DR et HLA-DP4 dérivés de TERT pour étudier les réponses CD4 Th1 anti-tumorales circulantes chez des patients atteints de cancers. Pour cela l'équipe de recherche a mis en place depuis 2011, plusieurs cohortes prospectives de patients atteints de cancers tels que le poumon, mélanome, colorectal…(Annexe 2).

Notre hypothèse est que la détection dans le sang périphérique de cette réponse adaptative peut être un outil universel et dynamique pour mesurer le statut immunitaire Th1 anti-tumoral ainsi que son rôle dans les cancers.

Ainsi l'objectif principal de mon projet de thèse était d'étudier et d'évaluer la relevance immunologique et clinique de la réponse CD4 Th1 anti-TERT circulante dans une cohorte de patients atteints de cancer du poumon (cohorte TeloCap 01).

Résultats

Article 1 : *Distinct prognostic value of circulating anti-telomerase CD4+ Th1 immunity and exhausted PD-1+/TIM-3+ T cells in lung cancer*

Caroline Laheurte[1,2], Magalie Dosset[1], Dewi Vernerey[1,3], Laura Boullerot[1,2], Béatrice Gaugler[4], Eléonore Gravelin[1,2], Vincent Kaulek[5], Marion Jacquin[2], Laurie Cuche[5], Guillaume Eberst[5], Pascale Jacoulet[5], Elizabeth Fabre[6], Françoise Le Pimpec-Barthes[7], Eric Tartour[8], Marcelo De Carvalho Bittencourt[9], Virginie Westeel[1,5] and Olivier Adotévi[1,2,5*]

Statut : Publié dans *British Journal of Cancer* en 2019

Dans ce premier article, nous avons étudié les caractéristiques immunologiques de la réponse CD4 Th1 anti-TERT circulante dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) et évalué sa relevance clinique dans une cohorte de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC).

Pour cela, nous avons utilisé des collections de lymphocytes issus de patients atteints de CBNPC (n= 170) inclus dans la cohorte TeloCap 01 de 2010 à 2014. Il s'agit de patients de stade I à IV de CBNPC inclus au moment du diagnostic. Ainsi les prélèvements étaient réalisés avant tout traitement y compris avant la chirurgie.
Les réponses CD4 Th1 anti-TERT ont été mesurées par technique ELISpot IFN-γ après une courte stimulation *in vitro* pendant 6 jours des lymphocytes sanguins avec les 8 peptides pan-HLADR et HLA-DP4 dérivés TERT décrits précédemment (table 9) (Godet et al., 2012b; Laheurte et al., 2016). Des peptides dérivés de 2 autres antigènes de tumeurs NY-ESO-1 et WT-1 ainsi que des peptides viraux dérivés de CMV, EBV et Influenzae ont été utilisés comme contrôles. Des paramètres immunologiques sanguins (cellules et solubles) pouvant influencer cette réponse tels que le taux des sous-populations de T, B, NK, T régulateurs (Tregs), l'épuisement lymphocytaire T, cytokines sériques de l'immunosuppression et de l'inflammation et facteurs liés à l'angiogenèse tumorale ont été mesurés par cytométrie en flux et par ELISA.

Résumé des principaux résultats :

- Les réponses T CD4 anti-TERT circulantes étaient présentes chez 35% des patients (59/170). Ces LT CD4 anti-TERT circulants produisent de l'IFN-γ, TNF-α et IL-2 et expriment

à leur surface CXCR3, caractéristiques d'une polarisation Th1. De plus, ces lymphocytes T CD4 anti-TERT sont CD45RA- et CCR7- en faveur d'un phénotype effecteur-mémoire (Tem).

- Une analyse par composante principale (ACP) a montré que la réponse Th1 anti-TERT circulante apparait comme un facteur indépendant parmi plusieurs paramètres immunitaires mais en opposition avec des facteurs immunologiques associés à l'immunosuppression comme les Tregs, IL-6 et surtout les lymphocytes T circulants de phénotype épuisé exprimant PD-1 et TIM-3.

- Nous avons montré une corrélation inverse entre la présence de la réponse Th1 anti-TERT et les taux circulants de lymphocytes T épuisés exprimant PD-1+/TIM-3+. Ainsi, les patients qui présentaient des réponses CD4 Th1 anti-TERT positives avaient des taux significativement plus bas de LT épuisés PD-1+/TIM-3+ comparés aux patients non répondeurs. Nous avons démontré que l'expression de ces récepteurs inhibiteurs pouvait interférer la détection des réponses anti-TERT Th1 périphériques chez les patients.

- Sur le plan clinique, nos résultats ont montré une corrélation inverse entre le stade du cancer et la prévalence de la réponse anti-TERT Th1. Ainsi une baisse du nombre de patients répondeurs à TERT était observée au fur et à mesure que le stade du CBNPC avance allant de 45% aux stades localisés à 24% aux stades métastatiques.

La présence d'une forte réponse Th1 anti-TERT circulante était associée à une meilleure survie globale chez les patients y compris au stade métastatique. La présence d'une forte réponse Th1 anti-TERT limite l'effet délétère liée à l'accumulation de lymphocytes T circulants CD4 coexprimant PD-1+/TIM-3+. Ainsi en utilisant les taux circulants de ces deux paramètres immunologiques, il était possible de stratifier les patients atteints de CBNPC selon différents groupes pronostiques.

En conclusion, nous avons mis en évidence un rôle opposé entre les réponses CD4 Th1 anti-TERT et les lymphocytes T PD-1+/TIM-3+ dans le sang périphérique. La présence d'une faible réponse CD4 Th1 anti-TERT circulante et d'un taux élevé de T CD4 épuisés PD-1+/TIM-3+ représente un facteur de mauvais pronostique dans le cancer du poumon.

Ce travail a permis de montrer l'histoire naturelle de la réponse Th1 anti-TERT dans le cancer bronchique et souligne l'intérêt d'utiliser cette systémique comme biomarqueur dynamique de l'immunité adaptative anti-tumorale et pour évaluer l'efficacité des immunothérapies.

BJC British Journal of Cancer

www.nature.com/bjc

ARTICLE

Cellular and Molecular Biology

Distinct prognostic value of circulating anti-telomerase CD4$^+$ Th1 immunity and exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells in lung cancer

Caroline Laheurte[1,2], Magalie Dosset[1], Dewi Vernerey[1,3], Laura Boullerot[1,2], Béatrice Gaugler[4], Eléonore Gravelin[1,2], Vincent Kaulek[5], Marion Jacquin[2], Laurie Cuche[5], Guillaume Eberst[5], Pascale Jacoulet[5], Elizabeth Fabre[6], Françoise Le Pimpec-Barthes[7], Eric Tartour[8], Marcelo De Carvalho Bittencourt[9], Virginie Westeel[1,5] and Olivier Adotévi[1,2,5]

BACKGROUND: Despite the critical roles of Th1-polarised CD4$^+$ T cells in cancer immunosurveillance, the translation of their potential to clinical use remains challenging. Here, we investigate the clinical relevance of circulating antitumor Th1 immunity in non-small cell lung cancer (NSCLC).

METHODS: The circulating antitumor Th1 response was assessed by the ELISpot assay in 170 NSCLC patients using a mixture of HLA class II-restricted peptides from telomerase (TERT). Phenotyping of blood immune cells was performed by flow cytometry.

RESULTS: TERT-reactive CD4 T-cell response was detected in 35% of NSCLC patients before any treatment. Functional analysis showed that these cells were effector memory and Th1 polarised capable to produce effector cytokines, such as IFN-γ, TNF-α and IL-2. The presence of anti-TERT Th1 response was inversely correlated with the level of exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$CD4 T cells. The level of these two immune parameters differentially affected the survival, so that increased level of anti-TERT Th1 response and low rate of exhausted PD-1$^+$TIM-3$^+$CD4$^+$ T cells were associated with a better prognosis.

CONCLUSIONS: Systemic anti-TERT Th1 response plays a strong antitumor protective role in NSCLC. This study underlines the potential interest of monitoring circulating antitumor Th1 response for patients' stratification and therapy decision.

British Journal of Cancer https://doi.org/10.1038/s41416-019-0531-5

BACKGROUND

A functional adaptive immune system, in which tumour antigens are recognised as foreign and eliminated, is fundamental for preventing cancer development and progression.[1] Research on cancer immunity and immunotherapy has mainly focused on the antitumor activity of cytotoxic CD8$^+$ T cells (CTL), but cumulative data also highlight a major role of CD4$^+$ T cells. Among the subpopulations of CD4$^+$ helper T cells, CD4$^+$Th1 subset that produces IFN-γ, TNF-α and interleukin-2 play a well-defined role in antitumor protection by orchestrating cell-mediated immunity against cancer cells.[2,3] This cell subset shows the capacity to enhance tumour-specific CD8$^+$ T-cell generation, function and memory.[4–6] Tumour-reactive CD4$^+$ Th1 T cells also promote the secretion of chemo attractants that support the entry of effector cells into the tumour site.[7,8] Emerging properties of CD4$^+$ helper T cells also indicate their involvement in inhibiting tumour angiogenesis,[9] promoting cancer cell senescence,[10] highly sensitive "neoepitope" recognition[11,12] and protecting effector CTLs from exhaustion.[6,8] In many human cancers, a Th1-polarised CD4$^+$ T-cell signature within the tumour microenvironment (TME) is associated with better survival.[13,14] Furthermore, evidence indicates that targeting CD4$^+$ T cells can significantly increase cancer immunotherapy efficacy, and may induce more durable tumour control than targeting CD8$^+$ T cells.[15,16] These properties underscore the importance of finding ways to better harness the clinical potential of CD4$^+$ helper T cells.

The comprehensive monitoring of tumour-reactive CD4$^+$ T cells is hampered by several hurdles, such as tumour antigen selection, HLA class II polymorphism, low frequencies of antigen-specific CD4$^+$ T cells and the plasticity of CD4$^+$ helper T cells.[17] One approach to circumventing these obstacles involves the ability of CD4$^+$ T cells to recognise degenerate HLA class II-restricted epitopes from relevant shared tumour-associated antigens.[18–21]

In this study, we investigated the clinical significance of circulating antitumor CD4$^+$ Th1 response in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). To this end, we quantified

[1]University Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France; [2]INSERM CIC-1431, Clinical Investigation Center in Biotherapy, Plateforme de Biomonitoring, F-25000 Besançon, France; [3]Department of medical Oncology, Methodology and Quality of Life Unit in Oncology, University Hospital of Besançon, F-25000 Besançon, France; [4]UPMC Univ Paris 06, INSERM UMR 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Universités, F-75012 Paris, France; [5]Department of Pneumology, University Hospital of Besançon, F-25000 Besançon, France; [6]Department of medical Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [7]Department of Thoracic surgery, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [8]Department of Biological Immuology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France and [9]University Hospital of Nancy and CECITA team, IMOPA UMR7365 University of Lorraine/CNRS, Laboratory of Immunology, Vandoeuvre-les-Nancy, France
Correspondence: Olivier Adotévi (olivier.adotevi@univ-fcomte.fr)

Received: 20 January 2019 Revised: 25 June 2019 Accepted: 3 July 2019
Published online: 30 July 2019

© The Author(s) 2019

Published by Springer Nature on behalf of Cancer Research UK

functional telomerase (TERT)-reactive CD4 T cells as a surrogate marker of antitumor Th1 response by using a mixture of HLA class II-restricted peptides.[22–24] Our results showed an unexpected relationship between the circulating TERT-reactive $CD4^+$ Th1 response and accumulated exhausted PD-1^+/TIM-3^+ $CD4^+$ T cells. It appears that a robust circulating anti-telomerase $CD4^+$ Th1 response plays a strong protective role in NSCLC patients, while high level of exhausted PD-1^+/TIM-3^+ CD4 T cells in peripheral blood is associated with poor prognosis. Thus, the level of adaptive antitumor $CD4^+$ Th1 immunity in peripheral blood could be used for NSCLC stratification.

METHODS

Patients and study design

The TeloCap01 study is a prospective multicentric immunomonitoring study conducted in patients with stage I–IV NSCLC. The primary objective of this study was to evaluate the landscape of telomerase-specific $CD4^+$ T-cell responses in patients with NSCLC. Between July 2010 and January 2014, 170 patients with NSCLC were included from the University Hospital of Besançon (Besançon) and the European Hospital Georges Pompidou (Paris). Before any therapy, including surgery, we collected and isolated blood lymphocytes, sera and plasma, which were frozen until use. Survival data were collected at 1 and 2 years after inclusion. Blood cells were also collected from anonymous healthy donors from the Etablissement Français du Sang (EFS, Besançon, France), following EFS guidelines. All patients and healthy donors gave their signed informed consent, and the protocol was approved by local ethic committees and the French national drug agency (N°EUDRACT: 2009-A00642-55).

Synthetic tumour antigen-derived peptides

To measure telomerase-specific $CD4^+$ T-cell responses in blood, we used a mixture of eight highly promiscuous HLA-DR and HLA-DP4-binding 15-mer peptides derived from telomerase (TERT), which has been previously described by our group.[24–26] In some experiments, we used mixtures of 15-mer peptides derived from NY-ESO-1 or Wilms tumour (WT-1). To evaluate the antiviral T-cell responses, we used peptide mixtures derived from influenza virus (Flu), Epstein Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) (PA-CEF-001), which were purchased from JPT (Germany) or CTL (Cellular Technology Ltd, Germany) at >80% purity.

In vitro stimulation for the detection of tumour-reactive $CD4^+$ Th1 responses in blood

Telomerase-specific $CD4^+$ Th1 responses were assessed in peripheral blood mononuclear cells using a standard IFN-γ ELISpot assay, following in vitro stimulation, as previously described.[24–26] Briefly, PBMCs ($3–4 \times 10^6$) were cultured for 6 days in 24-well plates in the RPMI with 5% human serum and 1% penicillin–streptomycin, along with the mixture of TERT-derived peptides (5 µg/mL). Recombinant interleukin 7 (IL-7; 5 ng/mL; Peprotech) was added on day 1, and recombinant interleukin-2 (IL-2; 20 UI/mL; Novartis) was added on day 3. In some patients' samples, stimulation was performed with a mixture of peptides derived from NY-ESO-1 and WT-1. To assess antiviral T-cell responses, cells were stimulated with a mixture of peptides derived from CMV, EBV and Flu (1 µg/mL), following a similar procedure. Then, the presence of specific T cells was measured using IFN-γ ELISpot assay or cytokine intracellular staining.

IFN-γ ELISpot assay

ELISpot assay was performed according to the manufacturer's instructions (Diaclone, France). Briefly, lymphocytes from in vitro stimulation (10^5 per well) were incubated for 18 h at 37 °C in an ELISpot plate pre-coated with anti-human IFN-γ monoclonal antibody, with or without peptide mixtures in the X-vivo 15 medium (Ozyme, BE04-418). Cells cultured with medium alone or PMA/ionomycin (5 µg/mL; Sigma-Aldrich, L2759) were used as negative and positive controls, respectively. IFN-γ-secreting T cells, i.e., spot-forming cells in this assay, were counted using the C.T.L. Immunospot system. After subtracting the negative control values (background), we calculated the number of IFN-γ spots per 10^5 cells. A response was considered positive if the number of IFN-γ spots per 10^5 cells was both >10 and more than two times the background.[27] The results are presented as a ratio, calculated as follows: [(number of spots in the TERT-peptide conditions) −(number of spots in the medium conditions)]/(number of spots in the medium conditions). All experiments were conducted in triplicate.

Flow cytometry

Absolute numbers of T cells, B cells and NK cells were determined in fresh samples using a single-platform flow cytometry approach, applying the TetraCXP method with Flow-Count fluorospheres (Beckman Coulter, Villepinte, France) and TetraCHROME antibodies (CD45/CD4/CD8/CD3/CD19/CD56, Beckman Coulter), according to the manufacturer's recommendations. Blood immune cells, including T_{regs} ($CD3^+CD4^+CD127^-CD25^+$FOX-$P3^+$) and exhausted T cells (PD-1^+TIM-3^+), were measured in thawed PBMCs using flow cytometry. Briefly, PBMCs were thawed and incubated for 10 min at 4 °C with Fixable viability dye (eBioscience), and then for 30 min at 4 °C with the corresponding surface antibodies. In some experiments, Ki-67 staining (Miltenyi) was performed. For intracellular staining (FOXP-3, Ki-67), cells were fixed and permeabilised using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (00-5523-00, eBioscience), following the manufacturer's protocol.

For intracellular cytokine staining (ICS), cells were incubated with TERT peptides (5 µg/ml) in the X-vivo 15 medium. After 6 h, BDGolgiPlug™ (BD Biosciences) was added, and cells were stimulated 15 h before staining with antibodies against CD3, CD4, CD8, IFN-γ, TNF- α, IL-2 and IL-17 using DuraClone™ IF T activation or DuraClone™ IF T helper (Beckman Coulter). In some ICS experiments, following markers ICOS, CCR7, CD45RA, CXCR3 and CCR6 were used for phenotypic analysis. Cells were acquired on FACSCanto™ II cytometer (BD Biosciences), and data were analysed using FACSDiva™ and Kaluza™ softwares. A table in the Supplementary Methods presents the complete list of monoclonal antibodies used for immune cells characterisation.

In vitro blockade of immune checkpoint receptors

PBMC (2×10^6) were cultured in 24-well plates with TERT-derived class II peptides as above and with the following blocking antibodies: anti-PD-1 (Nivolumab, BMS, Pharmacy unit, University Hospital Besançon), anti-TIM-3 (clone F38-2E2, eBioscience) and anti-PD-L1 (clone MIH1, eBioscience). Blocking antibodies (5 µg/ml) were added in the culture at day 0 and day 3. Cells cultured in presence of mouse IgG1 κ (clone P3.6.2.8.1, eBioscience) and human IgG4 (clone ET904, Biolegend) isotypes were used as control for anti-PD-L1/anti-TIM-3 and anti-PD-1 antibodies, respectively. Specific CD4 T-cell responses were measured after 6 days of in vitro stimulation with IFN-γ-ELISpot and ICS.

Blood cytokines measurement

In the patients' sera samples, we assessed a panel of cytokines, including IL1β, IL-5, IL6, Il-8, IL-13, IL17, IL10, TNF-α and TGFβ, using a Cytometric Bead Array kit, CBA assay (BD Biosciences), following the manufacturer's instructions.

Statistics

Descriptive statistics are described as mean or median, with the interquartile range for continuous variables. The non-parametric Student's *t* test (Mann–Whitney U-test) was used for two-group comparisons. Categorical variables were expressed as frequency (percentage). Proportions were compared using the χ^2 test or

Fisher's exact test, as appropriate. We performed hierarchical cluster analysis and constructed dendrograms using the online Morpheus software and robust Z-score normalisation (https://software.broadinstitute.org/morpheus/). To explore the relationship between anti-TERT CD4 Th1 response and all blood immune parameters, we used a principal component analysis (PCA) approach, using the dudi.pca module of the ade4 package of R software (version 2.10.1). For survival analysis according to anti-TERT Th1 response, we determined a threshold using the median ratio (3.7, IQR: 2.6–7.5) of IFN-γ spots between the TERT-derived peptides stimulation and the negative control. Overall survival (OS) was calculated from the date of study enrolment to the date of death from any cause. Surviving patients were censored at the time of their last follow-up assessment. OS was estimated using the Kaplan–Meier method, described using median or rate at specific time points and 95% confidence interval (95% CI), and compared among the groups using the log-rank test. For comparisons among multiple groups, we performed analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction. Cox proportional hazard models were used to estimate the hazard ratio (HR) and 95% CI for factors associated with OS. We first performed univariate Cox analysis to assess the association of parameters with OS. Then parameters with *P*-values of <0.05 were entered into the final multivariable Cox regression model. To check the assumption of proportionality, we plotted log-minus–log-survival curves and constructed cumulative martingale process plots. All analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary NC), R software version 2.15.2 (R Development Core Team, Vienna, Austria; http://www.r-project) and Prism software version 6 (Graph Pad software, La Jolla, CA, USA). Considering the descriptive and exploratory approaches used, *P*-values were uncorrected for multiple testing. All tests were two sided, and differences were considered statistically significant at the level of $P < 0.05$.

RESULTS

Circulating TERT-reactive CD4$^+$ T cells are effector memory and Th1 polarised in NSCLC patients

To measure pre-existing antitumor CD4$^+$ Th1 response in NSCLC patients, we quantified telomerase-reactive CD4$^+$ T-cell response by IFN-γ ELISpot assay using a mixture of highly promiscuous HLA class II-restricted peptides derived from telomerase as previously described[22–25] (Fig. 1a). We evaluated this response in 170 treatment-naive NSCLC patients and 22 healthy donors (HD) as control. Patients' main clinical characteristics are depicted in Supplementary Table 1. The presence of spontaneous TERT-reactive CD4$^+$ T-cell response was found in 59 NSCLC patients (35%). The median ratio of anti-TERT CD4$^+$ T cells was 3.7 (IQR: 2.6–7.5) in responders patients, and the distribution showed two groups with low and high responses (Fig. 1b–d). The frequency of TERT-specific CD4$^+$ T cells in age-matched HD was 45% (10/22) in accordance with recent observation reporting high precursor frequencies of tumour antigen-specific CD4$^+$ T cells in healthy subjects (Supplementary Fig. 1).[21] No change of anti-TERT CD4$^+$ T-cell response was observed according to patients' main clinical characteristics, such as age, smoking status, histology and mutational status (Supplementary Table 2). To exclude possible abnormality of antigen-specific memory T cells compartment, we concomitantly measured T-cell reactivity against a mixture of viral peptides (CMV, EBV, Flu) by IFN-γ ELISpot. As expected, the antiviral recall T-cell responses were detected in the majority of patients (81%) and healthy subjects (94%) (Supplementary Fig. 1). Thus, the absence of anti-TERT Th1 response was not related to an intrinsic incapacity of T cells to respond to a stimuli.

Phenotypic characterisation using CCR7 and CD45RA differentiation markers showed that, in contrast to IFN-γ-negative population, TERT-specific CD4$^+$ T cells detected by ELISpot assay were CCR7$^-$CD45RA$^-$ corresponding to effector memory phenotype and also overexpressed activation marker ICOS (Fig. 1e). We also demonstrated CXCR3 but not CCR6 expression on circulating TERT-reactive CD4 T cells, characteristic of a Th1 phenotype (Fig. 1f). Besides the IFN-γ production, these cells concurrently produced TNF-α, and IL-2, but neither IL-4 nor IL-17 in response to TERT stimulation (Fig. 1g). Thus, pre-existing TERT-specific CD4$^+$ T cells detected in NSCLC patients are polyfunctional and effector memory Th1 cells.

The presence of anti-TERT Th1 response is inversely correlated with the level of exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells in NSCLC patients

To identify immune factors likely to influence the circulating anti-TERT Th1 response, we concurrently measured additional blood immune parameters, including lymphocyte subsets, regulatory T cells (T_{regs}) and cytokines. As expected, the presence of anti-TERT Th1 response was associated with CD4, but not with CD8, NK or B lymphocyte count in blood (not shown).

Unsupervised clustering analysis revealed that the anti-TERT Th1 response was differently clustered compared with NK cells, inflammatory and inhibitory cytokines, T cells expressing exhaustion markers PD-1 and/or TIM-3 (PD-1$^+$/TIM-3$^+$), and antiviral T-cell responses. Notably, the heatmap identified a group of patients with low levels of PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells, which predominantly included the anti-TERT Th1 responders (Fig. 2a). We also performed PCA to dissect the mutual interactions of these blood immune factors, which revealed that these factors were grouped similarly as in the heatmap clustering (Fig. 2b, c). We identified four distinct immune patterns, which segregated according to the two axes of the PCA. Surprisingly, the circulating anti-TERT Th1 response appeared as an independent factor in the correlation circles, which was opposite to factors that drive immunosuppression, including T_{regs}, IL-6 and mainly PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells (Fig. 2b, c).

Thus, we focused on the relationship between anti-TERT Th1 response and PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells. Firstly, we showed that the rate of both CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells expressing PD-1 or TIM-3 was higher in NSCLC patients than HD. Notably, the circulating T cells co-expressing both PD-1 and TIM-3 (PD-1$^+$TIM-3$^+$T cells) were preferentially detected at high level in NSCLC patients (Fig. 2d, e). As shown in Fig. 3a, patients with an anti-TERT Th1 response had significantly lower rates of circulating PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells than non-responders NSCLC patients. Particularly, the association with the presence of anti-TERT Th1 response was more pronounced with TIM-3 expressing CD4 and CD8 T cells (Fig. 3b). No obvious relationship was found between the intensity of anti-TERT Th1 response and circulating level of PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells (not shown). In addition, the antiviral T-cell responses were not affected by PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells in cancer patients (Fig. 3c, d).

PD-1 and TIM-3 are inhibitory receptors involved in T cells exhaustion.[28,29] These receptors are commonly expressed on antigen-experienced T cells in the context of a chronic antigen stimulation (virus infection or cancer), and T-cell co-expressing PD-1 and TIM-3 were characterised by a loss of most T-cell functions.[28,29] So, we investigated the functions of circulating PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells detected in NSCLC patients. As expected, we showed low expression of the proliferation marker Ki-67 on PD-1$^+$/TIM3$^+$ CD4$^+$ T cells and in PD-1$^+$/TIM3$^+$ CD8$^+$ T cells (Fig. 3e and not shown). We next evaluated the capacity of these cells to produce Th1-associated cytokines when PD-1 and TIM-3 pathways were disrupted. Hence, the addition of blocking antibodies against the PD-1/PD-L1 axis or against TIM-3 effectively restored IFN-γ and TNF-α production by T cells in response to tumour antigens (Fig. 3f, g). Thus circulating PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells dysfunction observed was characteristic of a T-cell exhaustion state.

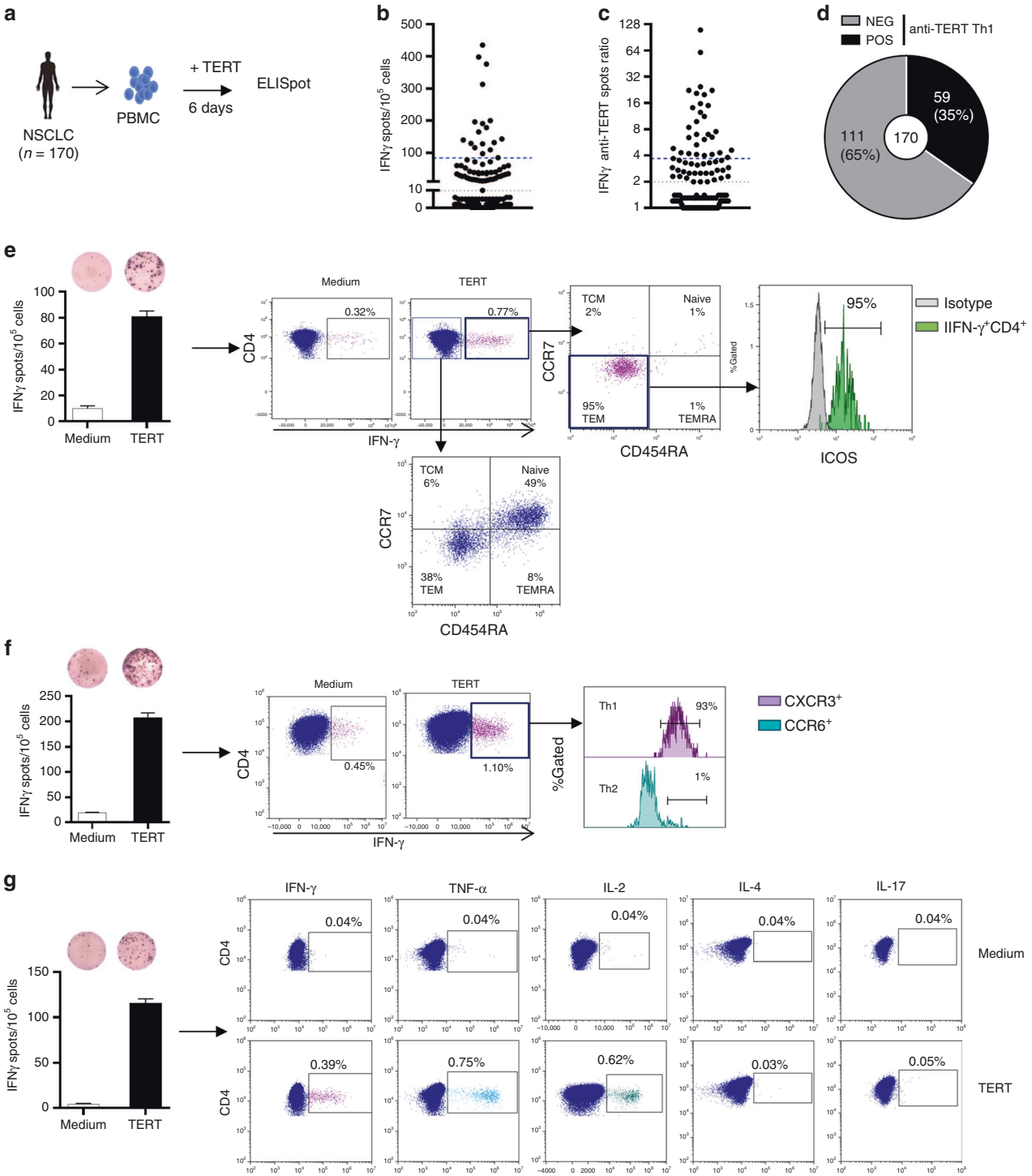


Fig. 1 Distribution and functional characterisation of TERT-specific CD4$^+$ T cells in patients with NSCLC. **a** TERT-specific CD4$^+$ T-cell responses were evaluated in 170 naïve-NSCLC patients by IFN-γ ELISpot assay performed after an in vitro stimulation of PBMC with HLA class II peptides derived from TERT. **b**, **c** Distribution of anti-TERT IFN-γ CD4$^+$ T cells in NSCLC patients ($n = 170$), shown as the number of spots (**b**), and ratio of spots (**c**). Grey lines indicate the positivity thresholds, and blue lines indicate the median of spots calculated in responders patients. **d** Frequency of patients with negative (NEG) and positive (POS) anti-TERT Th1 responses. **e**–**g** Phenotypic and functional characterisation of anti-TERT CD4$^+$ T cells detected by flow cytometry. **e** Dot plots of one representative patient show CCR7 and CD45RA and ICOS staining in IFN-γ$^-$/IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T cells. **f** Dot plots of one representative patient show CXCR3 and CCR6 staining in IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T cells. **g** Dot plots of one representative patient show IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 and IL-17 cytokines production in response to TERT stimulation. The data are representative of three independent experiments

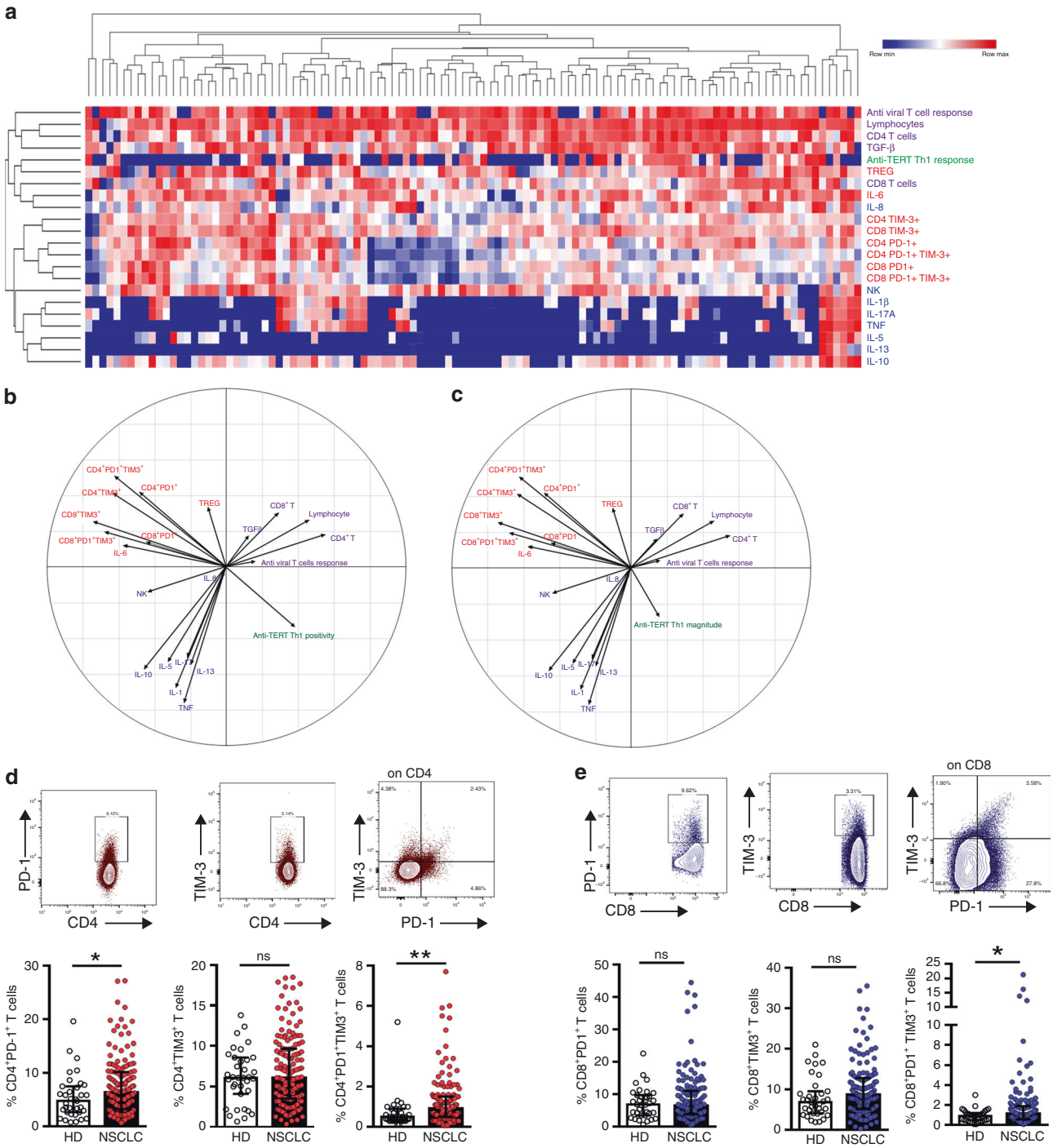
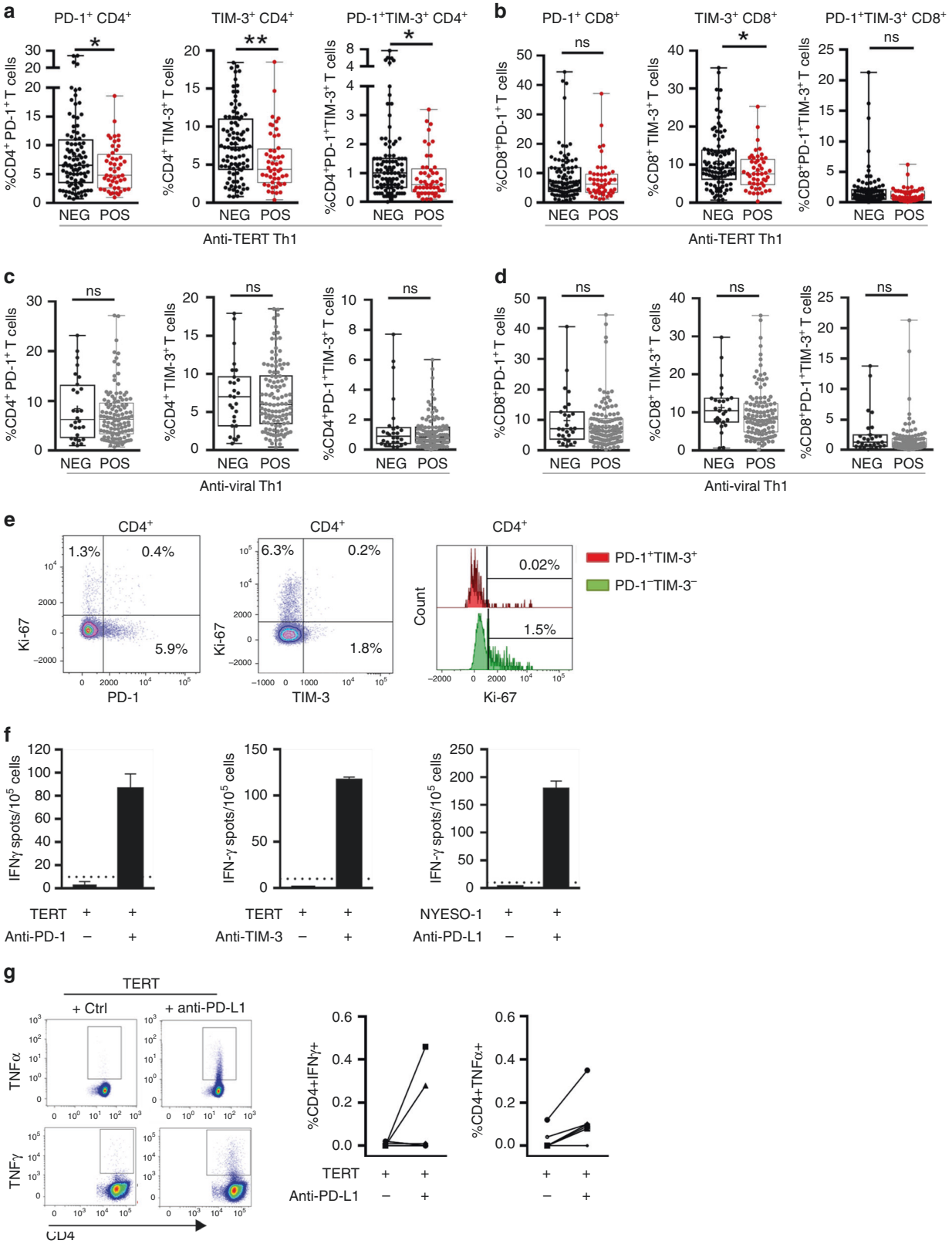


Fig. 2 Relationship between TERT-specific CD4$^+$ Th1 response and blood immune factors in patients with NSCLC. **a** Heatmap illustrating hierarchical clustering (Euclidean distance) of 22 blood immune parameters (in rows) from NSCLC patients ($n = 110$) (in columns). **b**, **c** Unsupervised principal component analysis (PCA), including frequency (**b**) and magnitude (**c**) of anti-TERT Th1 response in relation to 21 blood immune parameters. **d**, **e** Representative dot plots (top row) show expressions of PD-1 and/or TIM-3 among CD4$^+$ T cells (**d**) and CD8$^+$ T cells (**e**). Histograms show peripheral T-cell expression levels of PD-1, TIM-3 and PD-1$^+$ TIM-3$^+$ among CD4$^+$ T cells (**d**) and CD8$^+$ T cells (**e**) from healthy donors (HD, $n = 35$) and NSCLC patients ($n = 109$). Median and interquartile range (IQR) are indicated (Mann–Whitney test). *$P < 0.05$; **$P < 0.01$. ns not significant

NSCLC progression is associated with a decrease of functional anti-TERT Th1 response and accumulation of exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells

The concept of cancer immune surveillance suggests that tumour progression is accompanied by an accumulation of immune escape factors, to the detriment of effector T-cell immunity.[1,30] Therefore, we explored whether NSCLC stage progression was accompanied by changes in the anti-TERT Th1 response and the level of exhausted T cells.

We found a significantly higher rate of exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD4$^+$ T-cell subsets in metastatic patients (stage IV, $n = 83$) than localised one (stages I–III, $n = 87$). But no obvious stage-related difference was observed with exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD8$^+$ T cells (Fig. 4a, b; Supplementary Table 3). Conversely, the



frequency of anti-TERT Th1 response gradually decreased with stage progression: 44.8% (39/87) versus 24% (20/83) in localised versus metastatic, respectively ($P = 0.004$). Accordingly, we found that the ratio of anti-TERT Th1 cells to exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells was significantly lower in metastatic than localised disease (Fig. 4c, d). The decrease of antitumor T-cell response in the metastatic stage was also found with two additional shared tumour-associated antigens such as WT-1 and NY-ESO-1 (Fig. 4e). In contrast, the antiviral T-cell responses were preserved throughout NSCLC stages, suggesting that these responses were not

Fig. 3 Inverse correlation between the presence of anti-TERT $CD4^+$ Th1 response and the level of exhausted PD-1^+TIM-3^+ T cells. **a**, **b** Levels of circulating PD-1^+ and/or TIM-3^+ $CD4^+$ T cells (**a**) and $CD8^+$ T cells (**b**) in patients with anti-TERT Th1 response ($n = 49$) and in non-responders ($n = 96$) (Mann–Whitney test). **c**, **d** Levels of circulating PD-1^+ and/or TIM-3^+ $CD4^+$ T cells (**c**) and $CD8^+$ T cells (**d**) in patients with antiviral Th1 response ($n = 116$) and in non-responders ($n = 28$) (Mann–Whitney test). Box spans indicate median and 25th–75th percentile, whiskers indicate the highest/lowest datapoints. **e** Dot plots show Ki-67 staining of unstimulated PBMC from one representative patient. **f**, **g** Blood lymphocytes from patients were stimulated with TERT-derived peptides with or without blocking mAb against PD-L1, PD-1 and/or TIM-3. TERT-specific T cells were measured by ICS or ELISpot. **f** Histograms show IFN-γ spot-forming cells from three representative patients. **g** In left, representative dot plot of TNF-α and IFN-γ-producing $CD4^+$ T cells; In right, percentage of IFN-γ and TNF-α-secreting anti-TERT CD4 + T cells ($n = 6$). The data are representative of three independent experiments. $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$. ns not significant

related to NSCLC evolution (Fig. 4f). Thus, in NSCLC, tumour growth was associated with a decrease of circulating antitumor Th1 responses, but an accumulation of exhausted PD-1^+/TIM-3^+ $CD4^+$ T cells.

Anti-TERT Th1 response and exhausted PD-1^+/TIM-3^+ $CD4^+$ T cells have distinct prognostic value in NSCLC

To assess the prognostic value of circulating anti-TERT Th1 immunity and exhausted PD-1^+/TIM-3^+ T cells in this cohort of treatment-naive NSCLC, we considered two groups of patients with low versus high circulating rates of these two immune parameters (see details in the Methods section and Supplementary Table 3).

Regardless the immune parameters, the median OS was 13 months in the metastatic population and not reached in localised patients, which is in line with the literature (data not shown).[31,32] We found that NSCLC patients who exhibited high rates of anti-TERT Th1 cells (anti-TERT $Th1^{high}$) had better median OS compared with patients with anti-TERT $Th1^{low}$ (not reached versus 12 months, $P = 0.009$). The two-year survival rate was 2.5-fold higher in the anti-TERT $Th1^{high}$ group compared with the anti-TERT $Th1^{low}$ group (59% versus 22%, respectively; $P = 0.006$) (Fig. 5a). This survival benefit was observed both in localised (not reached versus 21 months, $P = 0.050$) and in metastatic NSCLC (median OS of 17 versus 9 months, $P = 0.023$) (Fig. 5b, c). Of note, the metastatic patients received first-line therapy with platinum doublet chemotherapy (91%, 74/81) and seven patients with tyrosine kinase inhibitors. None of them have been treated with immune checkpoint inhibitors. So the difference in survival in this population could not be associated with the differences in first-line treatment (not shown).

Next, the prognostic value of exhausted PD-1^+/TIM-3^+ T cells was evaluated. No association was found with PD-1^+/TIM-3^+ $CD8^+$ T cells and clinical outcome in this cohort (not shown). Among immune responder patients, the presence of high rate of exhausted PD-1^+TIM-3^+ $CD4^+$ T cells was associated with a poor survival, the median OS was 12 months in this group and not reached in $CD4^+$PD-1^+TIM-3^{+low} group ($P = 0.05$). This effect was particularly observed in patients with localised disease (Fig. 5d; Supplementary Fig. 2). Although, the rate of T cells expressing the single receptor PD-1 did not affected patients clinical outcome, some trend of a negative association was found with high level of TIM-3^+ $CD4^+$ T cells (Supplementary Fig. 2). Univariate and multivariate Cox analysis confirmed that both the circulating anti-TERT Th1 cells and PD-1^+TIM-3^+ $CD4^+$ T cells were significantly but inversely associated with the survival and independent of metastatic stage (Table 1).

Based on our findings, we stratified patients into three prognostic groups (best, intermediate and poor) according to these two immune parameters. The best group represents patients with anti-TERT $Th1^{high}$/exhausted $CD4^+$PD-1^+TIM-3^{+low} profile (median OS not reached), the group of patients with anti-TERT $Th1^{low}$/exhausted $CD4^+$PD-1^+TIM-3^{+high} profile had a poor prognosis (median OS = 4 months) and the third group with intermediate survival had a similar evolution of the two immune parameters (high/high or low/low) (Fig. 5e, f). This stratification highlighted that anti-TERT Th1 response plays a strong antitumor protective role over the level of exhausted PD-1^+/TIM-3^+ T cells. Collectively, ours results indicated that the level of anti-TERT Th1 response and exhausted PD-1^+TIM$3^+$$CD4^+$ T cells have distinct prognostic value in NSCLC, so that the decrease of functional anti-TERT Th1 cells and increase of exhausted PD-1^+TIM-$3^+$$CD4^+$ T cells were associated with disease progression (Fig. 5g).

DISCUSSION

Numerous aspects of $CD4^+$ T-cell biology suggest that these cells are required for effective antitumor immunity and immunotherapy. Importantly, they have the ability to eliminate cancer cells, mainly in an indirect manner by influencing the TME.[2,5] Despite these critical antitumor immune functions, the clinical significance of $CD4^+$Th1 cells remains scarcely exploited. In this study, we performed a comprehensive systematic analysis of circulating antitumor $CD4^+$ Th1 response across NSCLC clinical stages, using anti-telomerase $CD4^+$ T-cell response as a surrogate marker of antitumor Th1 immunity. This approach enables dynamic monitoring of IFN-γ-producing tumour-reactive $CD4^+$ T cells using an ELISpot assay, regardless of HLA type.[22–26] Around 35% of therapy-naive NSCLC patients harboured circulating anti-TERT Th1. This proportion was in line with our previous findings, and with the overall prevalence of tumour-infiltrative lymphocyte (TIL) positivity identified in many human cancers.[14] The frequency of patients with circulating anti-TERT Th1 immunity decreased with NSCLC progression, being only 24% among metastatic stage IV compared with 45% and 55% in localised I–III and I–II stages, respectively. This lower frequency found in metastatic patients compared with localised ones and in healthy subjects (45%) suggested that tumour progression is associated with a defect of pre-existing anti-TERT $CD4^+$ Th1 immunity. Indeed, a similar decrease of T-cell responses directed against NY-ESO1 and WT-1 was observed, in metastatic stage. Interestingly, we demonstrated that the presence of a strong pre-existing anti-TERT Th1 response in blood was significantly associated with better OS in NSCLC patients with both localised and metastatic disease. In line with our findings, previous studies have also reported clinical benefits of pre-existing or therapy-induced circulating IFN-γ-secreting $CD4^+$ T cells against NY-ESO-1, 5T4, SOX2 and HPV-16.[15,33–36] These data support that a pre-existing antitumor $CD4^+$ Th1 signature in peripheral blood may confer tumour protection. However, given the descriptive nature of our study, it would be needed to validate these findings in another external cohort. Nevertheless, these results prompt us to stimulate anti-TERT $CD4^+$ T-cell response in NSCLC patients (NCT2818426).

The protective role associated with anti-TERT Th1 response could be explained by the functional characteristics of these cells. Indeed, TERT-reactive $CD4^+$ T cells detected in NSCLC patients were effector memory cells and polyfunctional Th1-polarised capable to produce effector cytokines such as IFN-γ, TNF-α and IL-2. Indeed, many evidences support that $CD4^+$ Th1 subset orchestrates cell-mediated immunity against cancer cells mainly by enhance tumour-specific $CD8^+$ T-cell functions, survival and migration in the TME. These antitumor roles of $CD4^+$ Th1 cells are

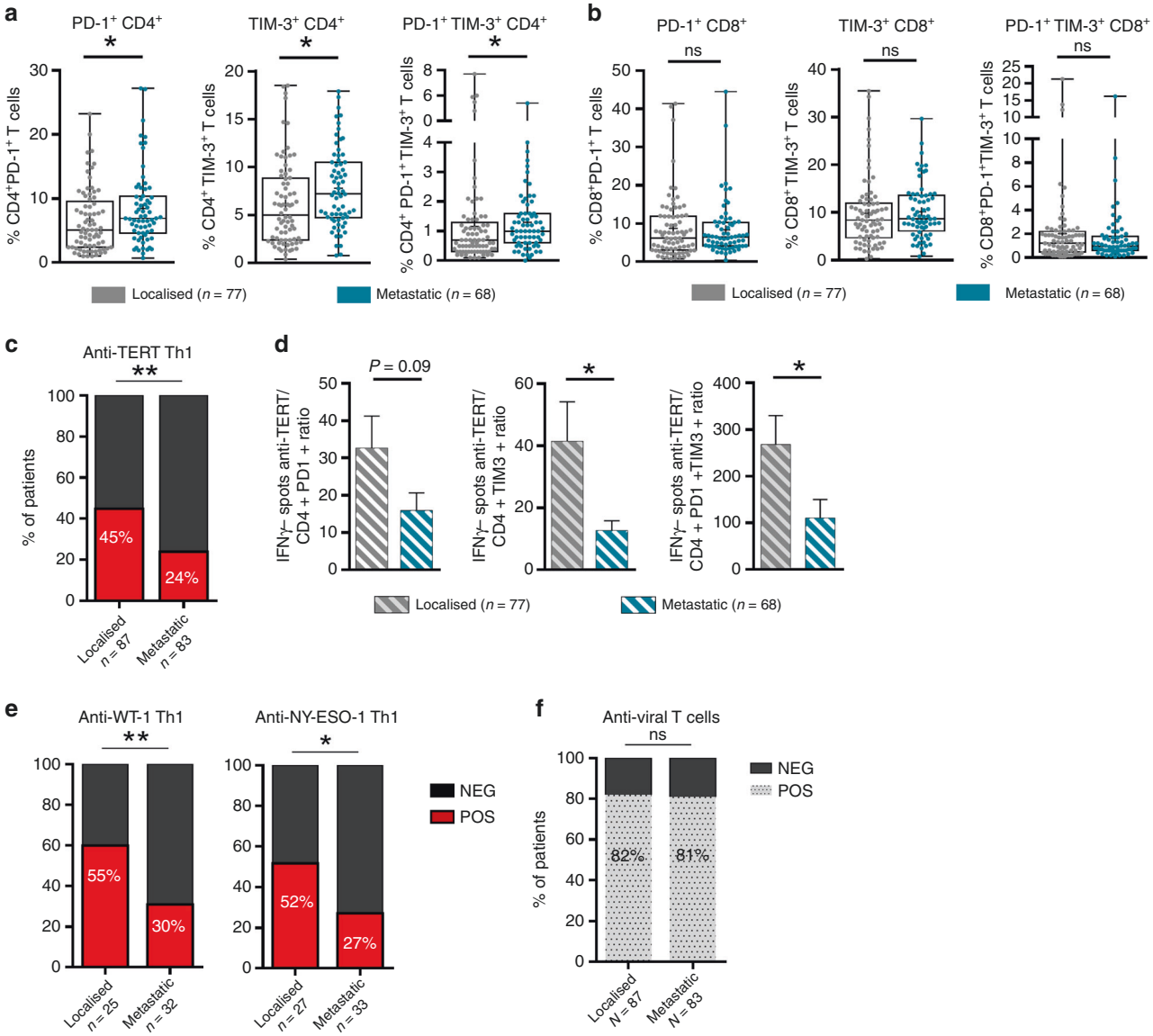


Fig. 4 Distribution of circulating exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells and anti-TERT Th1 response across NSCLC stages. **a**, **b** Levels of circulating PD-1$^+$ and/or TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells (**a**) and CD8$^+$ T cells (**b**) in localised NSCLC (stages I–III, $n = 77$) and metastatic NSCLC (stage IV, $n = 68$) (Mann–Whitney test). Box span indicates 25th–75th percentiles. Whiskers indicate the highest and lowest datapoints. **c** Frequency of circulating anti-TERT Th1 response in localised versus metastatic NSCLC (χ^2 test). **d** Ratio of anti-TERT IFN-γ spots to exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells in localised NSCLC ($n = 77$) and metastatic NSCLC ($n = 68$) (Mann–Whitney test). **e** Frequency of circulating IFN-γ antitumor Th1 response against WT-1, and NYESO-1, in localised versus metastatic NSCLC (χ^2 test). **f** Frequency of antiviral T-cell responses in localised NSCLC ($n = 87$) versus metastatic NSCLC ($n = 83$) (χ^2 test). Histograms indicate mean ± SD. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$. ns not significant

mainly driven by the triad of cytokines, such as IFN-γ, TNF-α and IL-2.[5,6] Furthermore, a clinical benefit associated with Th1-polarised signature in the TME has been reported in many human cancers.[13]

Prognostic value associated with CD8$^+$ TIL represents the current dogma of adaptive immune signature against cancers.[13,14,37] Here, circulating CD8$^+$ T-cell responses against HLA-A*0201 and HLA-B7-restricted peptides from telomerase were detected in 13% (8/60) of patients using the ELISpot assay (not shown). This low frequency, compared with telomerase-specific CD4$^+$ Th1 response, could be related to the use of highly selected and promiscuous HLA class II-binding peptides that cover more than 85% of the population,[22,24] or to the preferential localisation of these effector cells in the tumour. Since Th1-polarised CD4$^+$ T cells reportedly control CD8$^+$ T cells migration in the TME,[6,8] it could be expected that patients with potent circulating anti-TERT Th1 response showed high CD8$^+$ TIL, but this hypothesis deserves future investigations.

Targeting tumour-reactive CD4$^+$ T cells in peripheral blood raises questions regarding the choice of tumour-associated antigens.[20] Telomerase activity maintains tumour cell immortality by protecting cancer cells from telomere-dependent cell death, and telomerase overexpression is reported in the majority of human cancers.[38,39] The critical activities of telomerase during the oncogenesis process may also prevent immune escape via an antigen-loss mechanism.[1] Thus, the good prognostic value of a CD4$^+$ T-cell response against telomerase highlights the critical functions of this antigen.[40]

To search for factors influencing the presence of a TERT-reactive CD4$^+$ Th1 response in peripheral blood, we found an inverse correlation between the presence of anti-TERT Th1 response and the level of exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ T cells, particularly T cells

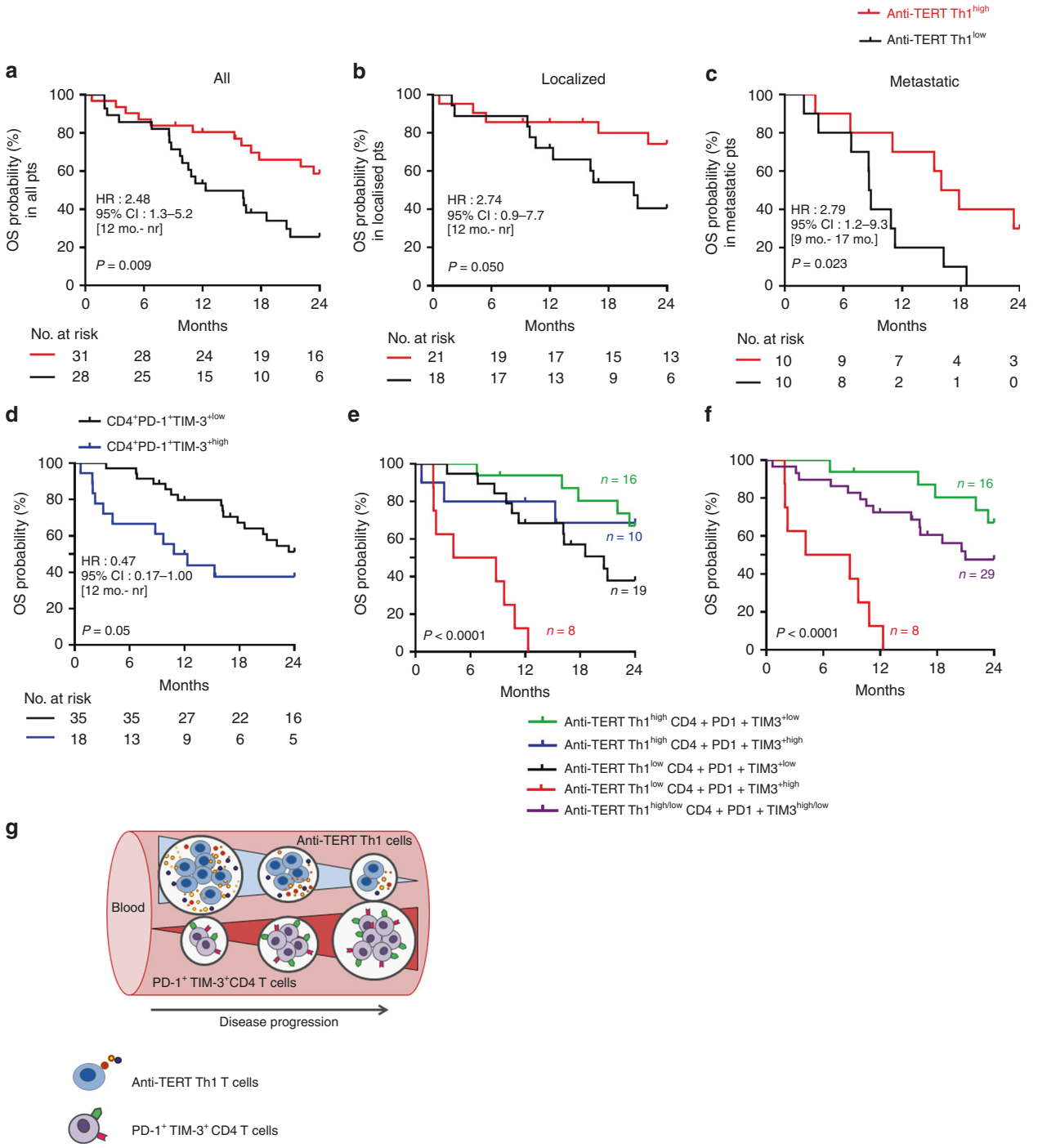


Fig. 5 Prognostic value of systemic anti-TERT Th1 response and exhausted PD-1$^+$/TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells in NSCLC. **a**–**c** Association between the level of circulating anti-TERT CD4 Th1 response and overall survival. A threshold (low < 3.7 < high) was defined based on the ratio of TERT-specific IFN-γ spots. Kaplan–Meier curves according to anti-TERT Th1 ratio: in all TERT responders ($n = 59$) (**a**), in localised stages ($n = 39$) (**b**) and in metastatic stages ($n = 20$) (**c**) (log-rank tests). **d** Association between the level of circulating PD-1$^+$TIM-3$^+$ CD4$^+$ T-cell subsets and overall survival. Two groups were determined based on the median rate of exhausted PD-1$^+$TIM-3$^+$ CD4$^+$ T-cell (0.9). Kaplan–Meier curves according to PD-1$^+$TIM-3$^+$ T cell (log-rank tests). **e**, **f** Patients were classified into distinct groups based on the anti-TERT CD4 Th1 ratio and the median level of PD-1$^+$TIM-3$^+$CD4$^+$T cells. **e**, **f** Kaplan–Meier curves for the following groups: anti-TERT Th1^{high}/CD4$^+$PD1$^+$TIM3^{low} (green), anti-TERT Th1^{high}/CD4$^+$PD1$^+$TIM3^{high} (blue), anti-TERT Th1^{low}/CD4$^+$PD1$^+$TIM3^{low} (black), anti-TERT Th1^{low}/CD4$^+$PD1$^+$TIM3^{high} (red) (log-rank test). Patients in the "blue" and "dark" groups are pooled in (**f**). **g** Schema of the relationship between anti-TERT Th1 immunity- exhausted PD-1$^+$TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cells and NSCLC progression

expressing TIM-3. The co-inhibitory receptors PD-1 and TIM-3 are well-known markers of T-cell exhaustion, which are expressed on tumour antigen-experienced T cells.[28,41] Previous reports in lung cancer, showed co-expression of PD-1 and TIM-3 on TIL are associated with poor prognosis.[42,43] Similar observations are reported in several other cancers, underlining the negative impact of exhausted T cells in cancer immunosurveillance.[44,45] This state of exhaustion is characterised by the loss of most T-cell functions,

Table 1. Cox proportional analysis for overall survival

Cox regression analyses		Univariate			Multivariate		
n = 59	*N*	HR[a]	95% CI[b]	*P*-value	HR[a]	95% CI[b]	*P*-value
Anti-TERT Th1 response							
Low (ratio < 3.7)	31	1			1		
High (ratio > 3.7)	28	0.396	0.192–0.817	0.0121	0.206	0.083–0.511	0.0007
Stage							
Localised (I–III)	39	1			1		
Metastatic (IV)	20	3.245	1.605–6.558	0.0010	3.545	1.579–7.960	0.0022
Histologic subtype							
Adenocarcinoma	30	1					
Squamous cell carcinoma	12	0.902	0.396–2.054	0.8056			
PD-1$^+$ CD4 T cells							
Low	32	1					
High	21	0.973	0.445–2.128	0.9462			
TIM-3$^+$ CD4 T cells							
Low	36	1					
High	17	1.880	0.872–4.057	0.1075			
PD-1+/TIM-3$^+$ CD4 T cells							
Low	35	1			1		
High	18	2.126	0.980–4.609	0.0562	2.793	1.173–6.649	0.0203
PD-1$^+$ CD8 T cells							
Low	28	1					
High	25	0.977	0.457–2.089	0.9523			
TIM-3$^+$ CD8 T cells							
Low	33	1					
High	20	0.660	0.288–1.510	0.3253			
PD-1+/TIM-3$^+$ CD8 T cells							
Low	31	1					
High	22	1.457	0.681–3.119	0.3323			

Univariate and multivariate analysis for OS based on anti-TERT Th1 response, exhausted PD1$^+$TIM-3$^+$ T cells and main clinical characteristics
[a]Hazard ratio
[b]Confidence intervals

including effector cytokines production, proliferation and cytotoxicity[28], and likely explains the poor prognosis associated with exhausted T-cell accumulation. The apparent anti-exhaustion role of the anti-TERT Th1 response is in agreement with findings in mice, showing that CD4$^+$ helper T cells protect CD8$^+$ T cells from exhaustion by downregulating expressions of the co-inhibitory receptors PD-1, TIM-3 and Lag-3.[8] In a recent investigation using deep single-cell RNA sequencing to analyse the T-cell landscape in lung adenocarcinoma, the authors found that a high ratio of pre-exhausted to exhausted PD-1$^+$TIM-3$^+$ T cells was associated with better prognosis. They also reported that the TILs from lung adenocarcinoma had a gene signature similar to that of blood T lymphocytes.[43] These observations, together with our findings, indicate that circulating tumour-reactive T cells may reflect occurrences in the tumour.[30,34,46]

Many reports emphasise the need for predictive biomarkers, in the hope of increasing responses to immune checkpoint inhibitors.[47,48] Current biomarkers are focused on PD-L1 expression, CD8$^+$ TILs and tumour mutational burden, however, emerging blood-based biomarkers have attracted considerable interest.[49,50] Indeed, liquid biopsy offers numerous advantages, including the potential for serial assessment and dynamic monitoring with minimal invasiveness. Accordingly, recent studies in NSCLC and melanoma reported pharmacodynamic changes of circulating Ki-67$^+$PD-1$^+$CD8$^+$ T cells following anti-PD-1 therapies.[46,51,52] Another report also demonstrated that high circulating central memory T cell to effector T-cell ratios were associated with better clinical outcome in NSCLC receiving anti-PD-1 therapy.[53] Our previous findings also support the critical role of treatment induced anti-TERT CD4$^+$ Th1 immunity. For example, reactivation of a systemic anti-TERT Th1 response after everolimus treatment improved patient survival in renal cell carcinoma by counterbalancing immune-suppressive T_{regs}.[25] More recently, the induction of anti-TERT Th1 response after immunogenic poly-chemotherapy significantly increased progression-free survival in patients with anal squamous cell carcinoma.[26] Thus, we strongly believed that the presence of a functional anti-TERT CD4$^+$ Th1 response may create a suitable inflamed environment for immune checkpoint inhibitor actions, in turn, improving therapy efficacy. The monitoring of anti-TERT Th1 response as potential biomarker for immunotherapy is currently evaluated in several cancers (NCT02840058).

In conclusion, our present study provides a new blood-based tool for NSCLC patients stratification. This approach could be rapidly deployed in routine clinical practice, and is likely also applicable to other cancers.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all patients who contributed to this study. We thank all of the medical doctors, and nurses, from oncologic department of University Hospital of Besançon and European Georges Pompidou hospital in Paris, for their contributions. The authors also thank the Biomonitoring platform of CIC-1431 for their technical support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

O.A. conceived, designed and was the principal investigator of this study; O.A., V.W., G.E., P.J, E.F. and F.L.P.-B. implemented the cohorts. C.L., B.G., L.B., E.G. and M.D.C. performed immune assessment assays and immunomonitoring; M.J. V.K. and L.C. performed data management, C.L., M.D., D.V. and O.A. interpreted the data and performed computational, statistical and biostatistical analyses. M.D. performed heatmap analyses. D.V. performed PCA analyses. O.A., CL., M.D. and D.W wrote the original draft of the paper. E.T., D.V., V.W., C.L., M.D. and O.A. reviewed and/or edited the paper.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41416-019-0531-5.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Ethics approval and consent to participate: All patients and healthy donors gave their signed informed consent, and the protocol was approved by local ethic committees and the French national drug agency (Comité de Protection des Personnes CPP Ile de France IV, 2009/17NICB, N°EUDRACT: 2009-A00642-55). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Funding: This work was supported by grants from Assistance Publique Hopitaux de Paris, La Ligue Contre le Cancer, the Conseil Regional de Franche-Comte, Canceropole Grand Est.

Consent to publish: All authors consent the material to publish.

Data availability: The data sets generated during and/or analysed during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

1. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 71 (2011).
2. Kim, H.-J. & Cantor, H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 91–98 (2014).
3. Zanetti, M. Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics. *J. Immunol.* **194**, 2049–2056 (2015).
4. Bevan, M. J. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 595–602 (2004).
5. Kennedy, R. & Celis, E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev. r* **222**, 44 (2008).
6. Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C. J. M. & Kastenmüller, W. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 635–647 (2018).
7. Bos, R. & Sherman, L. A. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res.* **70**, 8368–8377 (2010).
8. Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbała, N., Bovens, A., Xiao, Y. et al. CD4+ T cell help confers a cytotoxic T cell effector program including coinhibitory receptor downregulation and increased tissue invasiveness. *Immunity* **47**, 848–861 (2017). e5.
9. Kammertoens, T., Friese, C., Arina, A., Idel, C., Briesemeister, D., Rothe, M. et al. Tumour ischaemia by interferon-γ resembles physiological blood vessel regression. *Nature* **545**, 98–102 (2017).
10. Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M. et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361–365 (2013).
11. Linnemann, C., van Buuren, M. M., Bies, L., Verdegaal, E. M. E., Schotte, R., Calis, J. J. A. et al. High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat. Med.* **21**, 81–85 (2015).
12. Kreiter, S., Vormehr, M., van de Roemer, N., Diken, M., Löwer, M., Diekmann, J. et al. Erratum: mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* **523**, 370 (2015).
13. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
14. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 717–734 (2017).
15. Melssen, M. & Slingluff, C. L. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **47**, 85–92 (2017).
16. Spitzer, M. H., Carmi, Y., Reticker-Flynn, N. E., Kwek, S. S., Madhireddy, D., Martins, M. M. et al. Systemic immunity is required for effective cancer immunotherapy. *Cell.* **168**, 487–502 (2017). e15.
17. DuPage, M. & Bluestone, J. A. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 149–163 (2016).
18. Mandic, M., Castelli, F., Janjic, B., Almunia, C., Andrade, P., Gillet, D. et al. One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4+ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J. Immunol.* **174**, 1751–1759 (2005).
19. Kobayashi, H. & Celis, E. Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 221–227 (2008).
20. Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T. et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5323–5337 (2009).
21. Costa-Nunes, C., Cachot, A., Bobisse, S., Arnaud, M., Genolet, R., Baumgaertner, P. et al. High-throughput screening of human tumor-antigen specific CD4 T cells, including neo-antigen reactive T cells. *Clin. Cancer Res*. **25**, 4320–4331 (2019).
22. Godet, Y., Fabre, E., Dosset, M., Lamuraglia, M., Levionnois, E., Ravel, P. et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2943–2953 (2012).
23. Dosset, M., Godet, Y., Vauchy, C., Beziaud, L., Lone, Y. C., Sedlik, C. et al. Universal cancer peptide-based therapeutic vaccine breaks tolerance against telomerase and eradicates established tumor. *Clin. Cancer Res.* **18**, 6284–6295 (2012).
24. Laheurte, C., Galaine, J., Beziaud, L., Dosset, M., Kerzerho, J., Jacquemard, C. et al. Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4(+) Th1 responses against telomerase in cancer patients. *Oncoimmunology* **5**, e1137416 (2016).
25. Beziaud, L., Mansi, L., Ravel, P., Marie-Joseph, E. L., Laheurte, C., Rangan, L. et al. Rapalogs efficacy relies on the modulation of antitumor T-cell immunity. *Cancer Res.* **76**, 4100–4112 (2016).
26. Kim, S., François, E., André, T., Samalin, E., Jary, M., El Hajbi, F. et al. Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil chemotherapy for metastatic or unresectable locally recurrent anal squamous cell carcinoma (Epitopes-HPV02): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **19**, 1094–1106 (2018).
27. Moodie, Z., Price, L., Gouttefangeas, C., Mander, A., Janetzki, S., Löwer, M. et al. Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. *Cancer Immunol. Immunother CII.* **59**, 1489–1501 (2010).
28. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
29. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
30. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321–330 (2017).
31. Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E. & Adjei, A. A. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 584–594 (2008).
32. Nadler, E., Espirito, J. L., Pavilack, M., Boyd, M., Vergara-Silva, A. & Fernandes, A. Treatment patterns and clinical outcomes among metastatic non-small-cell lung cancer patients treated in the community practice setting. *Clin. Lung Cancer* **19**, 360–370 (2018).
33. Weide, B., Zelba, H., Derhovanessian, E., Pflugfelder, A., Eigentler, T. K., Di Giacomo, A. M. et al. Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1835–1841 (2012).
34. Spisek, R., Kukreja, A., Chen, L.-C., Matthews, P., Mazumder, A., Vesole, D. et al. Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy. *J. Exp. Med.* **204**, 831–840 (2007).
35. Peng, D., Kryczek, I., Nagarsheth, N., Zhao, L., Wei, S., Wang, W. et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature* **527**, 249–253 (2015).
36. Scurr, M. J., Brown, C. M., Costa Bento, D. F., Betts, G. J., Rees, B. I., Hills, R. K. et al. Assessing the prognostic value of preoperative carcinoembryonic antigen-specific T-cell responses in colorectal cancer. *J. Natl Cancer Inst*. **107**, 1–4 (2015).
37. Donnem, T., Hald, S. M., Paulsen, E.-E., Richardsen, E., Al-Saad, S., Kilvaer, T. K. et al. Stromal CD8+ T-cell density—a promising supplement to TNM staging in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2635–2643 (2015).
38. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
39. Shay, J. W. Role of telomeres and telomerase in aging and cancer. *Cancer Discov.* **6**, 584–593 (2016).
40. Zanetti, M. A second chance for telomerase reverse transcriptase in anticancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 115–128 (2017).
41. Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I. F., Sander, C. et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* **207**, 2175–2186 (2010).
42. Thommen, D. S., Schreiner, J., Müller, P., Herzig, P., Roller, A., Belousov, A. et al. Progression of lung cancer is associated with increased dysfunction of t cells defined by coexpression of multiple inhibitory receptors. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 1344–1355 (2015).
43. Guo, X., Zhang, Y., Zheng, L., Zheng, C., Song, J., Zhang, Q. et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat. Med.* **24**, 978–985 (2018).
44. Granier, C., Dariane, C., Combe, P., Verkarre, V., Urien, S., Badoual, C. et al. Tim-3 expression on tumor-infiltrating PD-1(+)CD8(+) T cells correlates with poor clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **77**, 1075–1082 (2017).
45. Giraldo, N. A., Becht, E., Vano, Y., Petitprez, F., Lacroix, L., Validire, P. et al. Tumor-infiltrating and peripheral blood T-cell immunophenotypes predict early relapse in localized clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 4416–4428 (2017).
46. Huang, A. C., Postow, M. A., Orlowski, R. J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S. et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature* **545**, 60–65 (2017).
47. Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A. & Pardoll, D. M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 275–287 (2016).
48. Cogdill, A. P., Andrews, M. C. & Wargo, J. A. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br. J. Cancer.* **117**, 1–7 (2017).

49. Schumacher, T. N. & Scheper, W. A liquid biopsy for cancer immunotherapy. *Nat. Med.* **22**, 340–341 (2016).
50. Gnjatic, S., Bronte, V., Brunet, L. R., Butler, M. O., Disis, M. L., Galon, J. et al. Identifying baseline immune-related biomarkers to predict clinical outcome of immunotherapy. *J. Immunother Cancer* **5**, 44 (2017).
51. Kamphorst, A. O., Pillai, R. N., Yang, S., Nasti, T. H., Akondy, R. S., Wieland, A. et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, 4993–4998 (2017).
52. Huang, A. C., Orlowski, R. J., Xu, X., Mick, R., George, S. M., Yan, P. K. et al. A single dose of neoadjuvant PD-1 blockade predicts clinical outcomes in resectable melanoma. *Nat. Med.* **25**, 454–461 (2019).
53. Manjarrez-Orduño, N., Menard, L. C., Kansal, S., Fischer, P., Kakrecha, B., Jiang, C. et al. Circulating T cell subpopulations correlate with immune responses at the tumor site and clinical response to PD1 inhibition in non-small cell lung cancer. *Front. Immunol.* **9**, 1613 (2018).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

Supplementary Materials and Methods

List of monoclonal antibodies used for flow cytometry:

Antibody / Reagent	Clone	Provider / Source
CD3 APC Alexa 750	WM53	BD Biosciences
CD4 BV421	RPA-T4	BD Biosciences
CD8 PerCP Cy5.5	SK1	Biolegend
TIM3 APC	F38.2E2	Biolegend
PD1 PE	MIH4	BD Biosciences
CD127 PerCP Cy5.5	eBioRDR5	eBioscience
CD25 BV421	MOPC-21	Biolegend
FoxP3 APC Alexa 647	259D	Biolegend
CTLA-4 PE	AD5-14H12	Miltenyi Biotec
IFN-γ APC	B27	BD Biosciences
Fixable Viability Dye eFluor506	-	eBioscience
CCR7 Pacific Blue	G043H7	Biolegend
CD45RA APC Cy7	HI100	Biolegend
ICOS FITC	C398.4A	Biolgend
CXCR3 Alexa Fluor 488	G025H7	Biolegend
CCR6 PerCP Cy5.5	G034E3	
DuraClone IF T activation	-	Beckman Coulter
DuraClone IF T Helper cell	-	Beckman Coulter
Ki-67 PerCP Cy5.5	REA183	Miltenyi Biotec

Supplementary Table 1

Main clinical characteristics of NSCLC patients

Patients with NSCLC	
Characteristics	**No. of pts**
Age mean, years	64.5 (57.5 - 70.5)
Gender	
Male	111/170 (65%)
Female	59/170 (35%)
Smoking status	
Current or former smoker	149/170 (87%)
Never smoker	22/170 (13%)
Performance status OMS	
0-1	135/168 (80%)
≥ 2	33/168 (20%)
Histologic subtype	
Adenocarcinoma	87/141 (62%)
Squamous cell carcinoma	37/141 (26%)
Other	17/141 (12%)
KRAS mutation	
Yes	19/74 (26%)
No	55/74 (74%)
EGFR mutation	
Yes	11/79 (14%)
No	68/79 (86%)
Stage	
I-II	38/170 (22%)
III	49/170 (29%)
IV	83/170 (49%)

Supplementary Table 2

Circulating anti-TERT Th1 responses according to patients' main clinical characteristics.

Clinical characteristics	Anti-TERT CD4 Th1 immune response					
	NEGATIVE (*N*=111)	**POSITIVE (*N* =59)**	***P***	**Low (*N*=28)**	**High (*N* =31)**	***P***
Age — years	64.7 (57.9- 70.6)	63.3 (55.1- 70.5)	*0.246*	60.6	63.8	*0.221*
Patient male sex	73 (66%)	38 (64%)	*0.867*	20 (71%)	18 (58%)	*0.65*
Smoking status						
Current or former smoker	97 (87%)	51 (86%)		27 (96%)	24 (77%)	
Never smoker	14 (13%)	8 (14%)	*0.861*	1 (0,03%)	7 (22%)	*0.08*
Performance status OMS						
0-1	87 (79 %)	48 (83%)		20 (71%)	27 (87%)	
≥2	23 (21%)	10 (17%)	*0.460*	6 (21%)	4 (13%)	*0.314*
Histologic subtype						
Adenocarcinoma	64 (65%)	23 (55%)		12 (43%)	11 (35%)	
Squamous cell carcinoma	25 (25%)	12 (29%)		5 (18%)	7 (22%)	
other	10 (10%)	7 (16%)	*0.439*	5 (18%)	2 (0,06%)	*0.555*
Mutation						
KRAS	*N* =53	*N* =21		*N* =7	*N* =8	
	13 (25%)	6 (29%)	*0.772*	3 (43%)	3 (37%)	*0.833*
EGFR	*N* =55	*N* =24		*N* =11	*N* =10	
	8 (15%)	3 (13%)	*1.000*	0	3 (30%)	*0.189*

P , Chi Square tests.

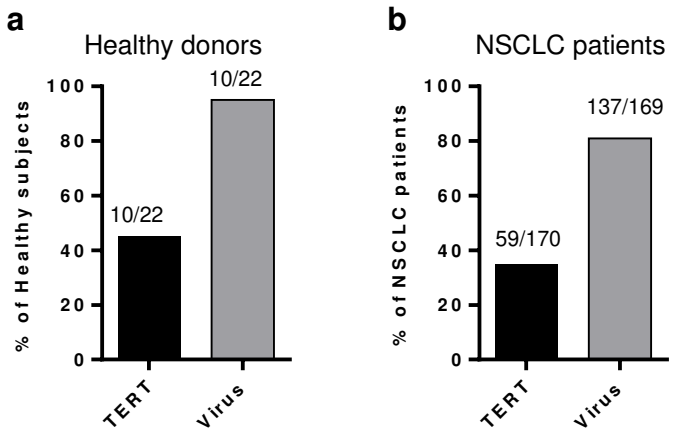
Supplementary Table 3

Level of circulating exhausted PD-1^{+}TIM-3^{+}T cells in NSCLC patients

	Overall			Localized			Metastatic			p-value
	N	mediane	IQR	N	mediane	IQR	N	mediane	IQR	
%CD4+PD-1+	**145**	**6.3**	**3.3-10.2**	**77**	5.1	1.0-23.2	68	6.9	0.7-27.2	**0.0192**
%CD4+TIM-3+	**145**	**6.1**	**3.6-9.7**	**77**	5.2	2.4-8.9	68	7.3	4.8-10.5	**0.0104**
%CD4+TIM-3+PD-1+	**145**	**0.9**	**0.5-1.5**	**77**	0.7	0.3-1.2	68	1	0.6-1.6	**0.0147**
% CD8+PD-1+	**145**	**6.4**	**3.8-11**	**77**	6.2	3.1-11.9	68	6.45	4.1-10.35	0.6472
%CD8+TIM-3+	**144**	**8.6**	**5.15-12**	**76**	8.4	4.8-12.15	68	8.65	6.3-12.15	0.3830
% CD8+TIM-3+PD-1+	**145**	**1.1**	**0.6-1**	**77**	1.2	0.5-2.2	68	0.95	0.6-1.75	0.6243

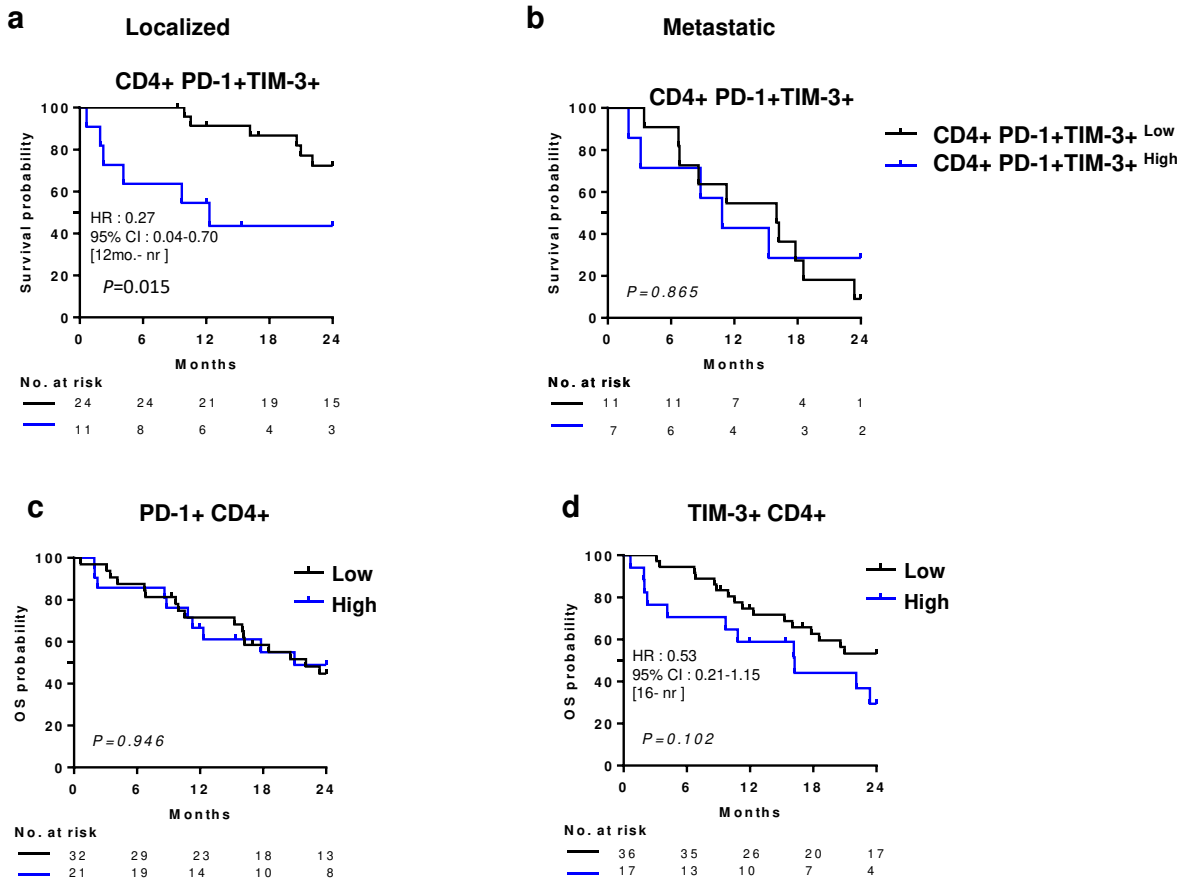
P, Mann & Whitney test (Localized versus Metastatic)

Supplementary Fig.1



Supplementary Figure 1: T cells responses against TERT and virus in age-matched healthy donors and NSCLC patients. **a**, Frequency of anti-TERT and anti-viral T cell responses in 22 age-matched healthy donors. **b**, Frequency of anti-TERT and anti-viral T cell responses in 170 NSCLC patients.

Supplementary Fig.2



Supplementary Figure 2: Association between the levels of circulating exhausted PD1$^+$ and/or TIM-3$^+$ CD4$^+$ T-cell subsets and overall survival. Two groups were determined based on the median rate of PD-1$^+$ or TIM-3$^+$ CD4$^+$ T cell subset (see Supplementary Table 3). **a and b**, Kaplan–Meier curves according to the median rate of PD-1$^+$TIM-3$^+$ CD4 T cells: in localized stages (*n* = 35) (**a**), and in metastatic stage (*n* = 18) (**b**) (log-rank tests). **c and d**, Kaplan–Meier curves according to the level of PD-1$^+$ CD4$^+$ T-cell (c) or TIM-3$^+$ CD4$^+$ T-cell (d) (log-rank tests).

Article 2 : Immunoregulatory role and clinical significance of ANGPT2/TIE2⁺ M-MDSC signature in Non-Small Cell Lung Cancer

Elodie Lauret Marie Joseph[1], Caroline Laheurte[1,2,3], Marine Jary[1,4], Laura Boullerot[1,3], Kamal Asgarov[1], Eléonore Gravelin[1,3], Adeline Bouard[1], Laurie Rangan[1], Magalie Dosset[1], Christophe Borg[1,3,4], Olivier Adotévi[1,2,3,4*].

Statut : Publié dans *Cancer Immunology Research* en 2019

Ce travail est en continuité du premier article réalisé dans la cohorte TeloCap 01 de patients atteints de CBNPC. L'analyse des facteurs pouvant influencer la réponse Th1 anti-TERT périphérique laissait supposer une relation opposée avec les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et certains marqueurs de l'angiogenèse tumorale notamment l'angiopoïétine-2 (ANGPT2).

L'ANGPT2 est un facteur proangiogénique surexprimé dans le microenvironnement tumoral (Augustin et al., 2009). ANGPT2 se lie à son récepteur principal Tie-2 (un récepteur à Tyrosine Kinase) exprimé à la surface des cellules endothéliales (Huang et al., 2010). Des travaux de Jary et al. de notre équipe avait montré que de fort taux d'ANGPT2 sérique était associé à un très mauvais pronostique dans le cancer colorectal (Jary et al., 2015). Des résultats similaires ont été rapportés dans plusieurs cancers y compris dans le cancer bronchique (Xu et al., 2017).

Cependant, contrairement au VEGF pour laquelle les propriétés immunosuppressives sont bien décrites, peu d'étude ont exploré les effets immunologiques associés à l'ANGPT2. Des travaux princeps des équipes De Palma et Coffelt ont montré que le récepteur d'ANGPT2, TIE2 est exprimé par des sous-populations de monocytes / macrophages appelés TIE2-expressing monocytes (TEM) (Palma MD Cancer cell 2005, Coffelt SB JImmunol 2011).
Nous avons donc formulé l'hypothèse que le rôle délétère d'ANGPT2 impliquerait une action sur le système immunitaire via les MDSC de type monocytaire (M-MDSC).
Ainsi au cours de ce travail nous nous sommes intéressés aux propriétés immunorégulatrices de l'ANGPT2 dans le CBNPC en utilisant les réponses Th1 anti-TERT périphériques comme « surrogate » marqueur de l'immunité adaptative anti-tumorale.

Cette étude a été réalisée chez 122 patients atteints de CBNPC, issus de la cohorte TeloCap-01 et sur 34 donneurs sains. Les réponses Th1 spécifiques des antigènes tumoraux TERT, NY-ESO-1 et WT-1 et contre les virus ont été mesurées comme dans l'article 1. Les taux sériques d'ANGPT2, VEGFA ont été dosés par test ELISA. Enfin, les sous-populations de MDSC monocytaires (M-MDSC) ont été analysées par cytométrie en flux.

Résumé des principaux résultats :

- Nous avons montré que TIE2 est surexprimé par des sous-types de M-MDSC issus de patients CBNPC comparé aux donneurs sains et que le taux sérique d'ANGPT2 était corrélé au pourcentage de MDSC-TIE2+ circulant. Une forte signature ANGPT2/M-MDSC TIE2+ est associée à un mauvais pronostic dans le CBNPC et notamment chez les patients ayant un cancer métastatique.

- Un taux élevé d'ANGPT2 était inversement corrélé à la présence de réponses Th1 anti-TERT circulantes chez les patients et à la réponse polyspécifique. De plus, les patients avec un profil sérique $ANGPT2^{high}$ présentait un environnement sanguin immunosuppresseur (concentrations sériques élevées de VEGFA, PGE2, TGFβ et IL-6). Ces résultats suggèrent un rôle inhibiteur de ANGPT2 sur l'immunité adaptative anti-tumorale.

- Sur un plan mécanistique, nous avons démontré la capacité de l'ANGPT2 à inhiber la fonction des lymphocytes Th1 anti-TERT via la sensibilisation des M-MDSC-TIE2+.

En conclusion ce travail a permis de décrire un nouveau mécanisme d'échappement tumoral impliquant l'axe ANGPT2/M-MDSC TIE2+ non connu précédemment et montré la relevance clinique de cet axe dans le cancer bronchique. L'utilisation de l'axe ANGPT2/M-MDSC TIE2+ seul ou en combinaison avec la réponse Th1 anti-TERT circulante pourrait être un biomarqueur de l'efficacité des immunothérapies.

Ce second travail a été réalisé avec Elodie Lauret Marie Joseph.
Ma contribution dans ce travail a été l'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeur et la caractérisation des sous-populations de MDSC, l'analyse des résultats et la participation à l'écriture de l'article.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

Immunoregulation and Clinical Implications of ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC Signature in Non–Small Cell Lung Cancer

Elodie Lauret Marie Joseph[1], Caroline Laheurte[1,2,3], Marine Jary[1,4], Laura Boullerot[1,3], Kamal Asgarov[1], Eléonore Gravelin[1,3], Adeline Bouard[1], Laurie Rangan[1], Magalie Dosset[1], Christophe Borg[1,3,4], and Olivier Adotévi[1,2,3,4]

ABSTRACT

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) promote immunosuppression and are a target in the field of immuno-oncology. Accumulation of MDSCs is associated with poor prognosis and resistance to immunotherapy for several cancers. Here, we describe an accumulation of a subset of circulating monocytic MDSCs (M-MDSC) overexpressing TIE2, the receptor for angiopoietin-2 (ANGPT2), in patients with non–small cell lung cancer (NSCLC). Greater numbers of circulating TIE2$^+$ M-MDSCs were detected in patients with NSCLC compared with healthy subjects, and this accumulation correlated with ANGPT2 concentration in blood. The presence of an ANGPT2-rich environment was associated with impairment of preexisting T-cell responses against tumor-associated antigens (TAA) in patients with NSCLC. We demonstrated that ANGPT2 sensitizes TIE2$^+$ M-MDSCs such that these cells suppress TAA-specific T cells. In patients with NSCLC, upregulation of the ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC signature in blood was associated with a poor prognosis. Our results identify the ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC axis as a participant in tumor immune evasion that should be taken into account in future cancer immunotherapy.

Introduction

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are heterogeneous populations of immature myeloid cells that pathologically accumulate in many cancers (1). MDSCs are classified into polymorphonuclear (PMN-MDSCs) and monocytic MDSCs (M-MDSC) that are phenotypically and morphologically similar to neutrophils and monocytes, respectively (2). MDSCs promote tumor progression and metastases, leading to a poor prognosis associated with their accumulation in various cancers (3, 4). In addition, MDSCs coordinate cancer cell plasticity and activate signaling pathways associated with drug resistance and angiogenesis (5–7). Although MDSCs are implicated in the inhibition of various immune effector cells, their main targets are antitumor T cells (8, 9). Indeed, immunosuppressive mechanisms reported, among others, include L-arginine deprivation–induced CD3 ζ chain downregulation and prevention of IL2R expression as well as production of reactive oxygen species (ROS), IL10, and TGFβ (10, 11).

The tyrosine kinase receptor TIE2 is primarily expressed on endothelial cells and is capable of binding to angiopoietin-2 (ANGPT2), a proangiogenic factor overexpressed in the tumor microenvironment (12, 13). TIE2-expressing monocytes/macrophages (TEM) have been described as subsets of peripheral and tumor-infiltrating myeloid cells and are found both in humans and mice (14–16). TEM exposure to ANGPT2 augments their ability to stimulate angiogenesis and to promote tumor growth (17, 18). In murine models, activation of the ANGPT2/TIE2 axis promotes immunosuppression in tumor microenvironment through multiple mechanisms (19, 20). However, expression of TIE2 on MDSC phenotypes from patients with cancer has not yet been investigated. Furthermore, the immunomodulatory roles of ANGPT2 are not as well understood as the immunomodulatory roles of VEGF, another regulator of tumor angiogenesis (21).

In this study, we analyzed the expression, distribution, and immunesuppressive role of different types of peripheral M-MDSCs in a cohort of patients with non–small cell lung cancer (NSCLC). We found an excess of circulating M-MDSCs overexpressing TIE2 related to the concentration of ANGPT2 in blood. We showed that the upregulation of the ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC signature in peripheral blood negatively affected patients' clinical outcome. Our results demonstrated the ability of an ANGPT2-rich environment to suppress preexisting T-cell responses against tumor-associated antigens (TAA) through a mechanism involving TIE2$^+$ M-MDSCs. Thus, high concentration of ANGPT2 combined with increased numbers of TIE2$^+$ M-MDSCs in blood signal a poor prognosis for patients with NSCLC through mechanisms in which antitumor T-cell responses are suppressed.

Materials and Methods

Study population

Patients with NSCLC were enrolled from 2010 to 2014 at the University Hospital Georges Pompidou (Paris, France) and University Hospital of Besançon (Besançon, France) in the TELOCAP 01 cohort, a prospective study of antitumor T-cell immunity in lung cancer (N°EUDRACT: 2009-A00642-55). Blood samples from patients with stages I to IV cancer were included before any anticancer therapy. All patients were enrolled with informed consent in accordance with French laws and after approval by the local and national ethics committees. The main clinical characteristics of the patients are

[1]Université Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS, BFC, UMR1098, RIGHT, Besançon, France. [2]Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, Besançon, France. [3]INSERM CIC-1431, CHU Besançon, Besançon, France. [4]Service d'Oncologie médicale, CHU Besançon, Besançon, France.

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

Corresponding Author: Olivier Adotévi, INSERM UMR1098, 8, rue du Docteur JF-Xavier Girod, Besançon Cedex 25020, France. Phone: 333-7063-2212; Fax: 333-7063-2431; E-mail: olivier.adotevi@univ-fcomte.fr

Cancer Immunol Res 2020;8:1–12

doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

©2019 American Association for Cancer Research.

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

summarized in Supplementary Table S1. PBMCs were isolated by density gradient separation on Ficoll Unisep tubes (Eurobio) and frozen until use. Information about patients' outcome was collected 1 and 2 years after their inclusion. Blood cells were also collected from 34 anonymous healthy donors (HD) at the Etablissement Français du Sang (EFS, Besançon France) with informed consent signature and following EFS guidelines.

Flow cytometry

To discriminate live from dead cells, PBMCs were first washed in 1× PBS (Gibco) and stained with eFluor 506 viability dye (eBiosciences) according to the manufacturer's instructions. For MDSC analysis, samples were surface-stained in the dark for 30 minutes at 4°C with a mixture of the following antibodies: PerCP-Cy5.5 anti-human HLA-DR (BioLegend, clone L243), BV421 anti-human CD14 (BioLegend, clone HCD14), APC anti-human CD33 (Becton Dickinson, clone WM53), PE-Cy7 anti-human CD11b (Becton Dickinson, clone ICRF44), and PE anti-human TIE2 (BioLegend, clone 33.1 Ab33). Lineage cocktail (lin) was composed of anti-human CD19 APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, clone J3-119), CD56 APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, clone N901), and CD3 APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, clone A94680). The following isotype controls were used for anti-CD11b: PE-Cy7 mouse IgG1, (Beckton Dikinson, clone MOPC-21), for anti-CD33: APC mouse IgG1 (Beckton Dikinson, clone MOPC-1), and for anti-TIE2: PE mouse IgG1 BioLegend, clone MOPC-1) antibodies (see also Supplementary Table S2).

For intracellular cytokine secretion assay (ICS), $CD4^+$ T-cell clones were cultured in the presence of TERT peptide (UCP2, 5 μg/mL) and GolgiPlug (BD Biosciences) for 12 hours at 37 °C in 5% CO_2. Then, $CD4^+$ T cells were surface-stained with BV421 anti-human CD4 (Becton Dickinson, clone RPA-T4) and APC Fire 750 anti-human CD3 (BioLegend, clone UCHT1). Then, intracellular cytokine labeling was performed following fixation and permeabilization using the BD Cytofix/Cytoperm kit, according to the manufacturer's instructions. After permeabilization, PE anti-human TNFα (BioLegend, clone MAb11) and APC anti-human IFNγ (Becton Dickinson, clone B27) antibodies were added for 30 minutes at 4°C and washed. Samples were acquired on a FACS BD Canto II (BD Biosciences) and analyzed with FACSDiva software (BD Biosciences).

TIE2 receptor quantification on MDSCs

To estimate the absolute number of TIE2 receptors expressed by each M-MDSC phenotype, PE-conjugated Quantibrite beads were used (BD Biosciences). Quantibrite tubes contain lyophilized beads conjugated with four determined concentrations of PE fluorochrome (low: 474 PE, medium-low: 5359, medium-high: 23843 and high: 62 336 PE molecules/beads). After reconstitution, Quantibrite tubes were loaded on the FACS BD Canto II cytometer, FSC/SSC were adjusted and a calibration curve was plotted and fitted by a linear regression according to the manufacturer's instructions. Then, circulating M-MDSCs from 5 healthy volunteers and 8 patients with NSCLC were stained as previously described and acquired. Mean fluorescence intensity values of TIE2 staining were converted in the number of TIE2 receptors per MDSC phenotype. Samples were acquired on a FACS BD Canto II (BD Biosciences) and analyzed with FACSDiva software (BD Biosciences).

Real-time quantitative reverse transcription PCR

Cells were collected in RLT buffer (Qiagen) and total mRNAs were extracted using RNAeasy Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). Total mRNA was reverse transcribed using the TaqMan gene expression assay Hs00945142_m1 (Thermo Fisher Scientific) and the CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Colo320 colon cancer cell line (RRID:CVCL_0219) and HT29 colorectal carcinoma cells (RRID:CVCL_0320) were used as positive controls for TIE2 expression. A549 lung carcinoma cells (RRID: CVCL_0023) were used as negative controls. All these cell lines were purchased at ATCC, cryopreserved, and routinely tested for *Mycoplasma* with Mycoalert detection kit (Lonza). Upon receipt, each cell line was expanded and stock vials were frozen. Each cell line was cultured no longer than one week before thawing a cryotube from the original stock.

Synthetic peptides

A previously described mixture of eight pan MHC class II-restricted peptides derived from telomerase (22, 23) as well as a mixture of overlapping 15-mer peptides derived from NY-ESO1 and from Wilms tumor 1 (WT1) were used to monitor circulating T-cell responses against TAAs. To assess antiviral T-cell immunity, peptide mixtures derived from influenza virus, Epstein–Barr virus and cytomegalovirus were used (PA-CEF-001). TERT-derived peptides were purchased from JPT (purity >80%) and all other peptides were purchased from CTL (Cellular Technology Ltd).

Assessment of spontaneous T-cell responses against TAAs by IFNγ ELISpot

T-cell responses were assessed by IFNγ ELISpot assay after a short *in vitro* stimulation as described previously (22, 23). Ficoll-isolated PBMCs were plated at 4×10^6 cells/well for 6 days in 24-well plates containing 5 μg/mL of the peptide mixtures derived from TERT, NY-ESO-1, WT1, and CEF. Recombinant interleukins, IL7 (5 ng/mL; PeproTech) and IL2 (20 UI/mL; Novartis) were added at days 1 and 3, respectively. At day 7, specific T-cell responses were measured by IFNγ ELISpot according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were incubated at 1×10^5 cells/well in X-Vivo 15 medium (Lonza) in a 96-well ELISpot plate with the relevant peptides for 15 hours. Cells cultured with medium or phorbol myristate acetate (PMA, 1 ng/mL)/ionomycin (500 ng/mL) were used as negative and positive controls respectively. Spots were revealed and spots forming cells were counted using the C.T.L Immunospot System (Cellular Technology Ltd). Responses were considered as positive when IFNγ spot numbers were twice higher than medium control and > 10.

Cytokine measurement

IL6, IL10, and TGFβ, production was measured in patients' serum using Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set (BD Biosciences). ANGPT2, VEGF-A, and prostaglandin E2 (PGE2) serum concentrations were assessed by ELISA assay (R&D Systems and Thermo Fisher Scientific, respectively).

ANGPT2/$TIE2^+$ M-MDSC axis suppression assay

PBMCs from patients with treatment-naïve metastatic NSCLC with $TIE2^+$ M-MDSCs were assessed for T-cell responses in the absence or presence of exogenous ANGPT2. Briefly, PBMCs were cultivated with or without 300 ng/mL of recombinant ANGPT2 (R&D Systems) and 5 μg/mL of TERT and NY-ESO-1–derived peptides. T-cell responses were assessed by IFNγ ELISpot as described above. In some experiments, PBMCs from untreated patients with metastatic NSCLC were depleted of TIE2-expressing $CD11b^+$ cells using $CD11b^+$ Macs Magnetic Microbeads Kit and separator according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Cells recovered from both depleted and undepleted fractions were stimulated *in vitro* with TERT-derived

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

peptides (5 μg/mL). Antigen-specific T-cell responses were measured by IFNγ ELISpot as described above.

TIE2$^+$ M-MDSCs and T-cell clone coculture

CD14$^+$ HLA-DR$^-$ M-MDSCs were magnetically sorted from HD PBMCs by using CD14$^+$ negative selection and HLA-DR positive selection kits according to the manufacturer's protocols (Miltenyi Biotec). Briefly, CD14$^+$ monocytes were first isolated by using a pan monocyte CD14$^+$ negative selection kit. The negative faction containing CD14$^+$ monocytes was collected and a positive HLA-DR selection was performed. The negative fraction containing CD14$^+$ HLA-DR$^-$ MDSCs was then collected. Next, TIE2 expression was assessed on sorted M-MDSCs as described above and coculture experiments were performed on TIE2^{low} and TIE2^{high} M-MDSCs. Then, TIE2 low or high CD14$^+$ HLA-DR$^-$ M-MDSCs were incubated for 3 hours in the presence or absence of recombinant ANGPT2 (300 ng/mL) and cocultured for 12 hours with 3×10^4 anti-TERT CD4$^+$ T-cell clones (ratio 1:1) in a 96-well plate. Anti-TERT T-cell clones were then assessed for their intracellular production of IFNγ and TNFα. Percentages of inhibition were calculated as:

[(% IFNγ$^+$ CD4$^+$ T-cell or TNFα$^+$ CD4$^+$ T-cell clones stimulated with TERT-derived peptide alone) − (% IFNγ$^+$ CD4$^+$ T-cell or TNFα$^+$ CD4$^+$ T-cell clones in the other tested wells) × 100]/(% IFNγ$^+$ CD4$^+$ T-cell or TNFα$^+$ CD4$^+$ T-cell clones stimulated with TERT-derived peptide alone).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 6 GraphPad Software. For two-group comparisons, the nonparametric Student *t* test (Mann–Whitney *U* test) was used. Frequency (percentage) was provided for the description of categorical variables. Proportions were compared using the χ^2 test (or Fisher exact test, if appropriate). Hierarchical clustering analysis was performed using the online Morpheus software (https://software.broadinstitute.org/morpheus/). Briefly, percentages of circulating M-MDSC and ANGPT2 concentrations were tabulated in a (.txt) file and loaded in Morpheus software. Data were normalized with $\log_2$ and robust Z-score according to the software guidelines. Clustering analysis was performed in row and columns according to the intensity of the scores calculated. For survival analysis, according to the amounts of TIE2$^+$ M-MDSCs and ANGPT2, we determined thresholds using the upper quartile of the median rate of each TIE2$^+$ M-MDSC phenotype (M-MDSC1: 16.7%, M-MDSC2: 6.7%, M-MDSC3: 5.9, M-MDSC4: 7.1% and M-MDSC5: 9.4%) or of ANGPT2: 3 ng/mL. Overall survival (OS) was calculated from the date of study enrollment to the date of death from any cause. Patients known to be alive were censored at the time of their last follow-up assessment. OS was estimated using the Kaplan–Meier method, described using median or rate at specific time points with 95% confidence intervals (95% CI), and compared among the groups with the log-rank test. All tests were two sided, and *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$).

Results

ANGPT2 concentrations predict accumulation of M-MDSCs overexpressing TIE2

In this study, we analyzed five phenotypes of circulating M-MDSCs in patients with treatment-naïve NSCLC ($n = 122$) and in healthy, control, donors ($n = 34$). These M-MDSC phenotypes were described previously (24): M-MDSC 1 (HLA DR^{low} CD14$^+$), M-MDSC 2 (lin$^-$ HLA-DR^{low} CD33$^+$), M-MDSC 3 (lin$^-$ HLA-DR^{low} CD11b$^+$), M-MDSC 4 (lin$^-$ HLA-DR^{low} CD33$^+$ CD11b$^+$), M-MDSC 5 (lin$^-$ HLA DR^{low} CD11b$^+$ CD33$^+$ CD14$^+$; **Fig. 1A**). We showed that all the five phenotypes of circulating M-MDSCs from patients with NSCLC and HDs expressed TIE2 (**Fig. 1B**). However, the percentage of circulating TIE2$^+$ M-MDSCs was 2 to 3 times higher in patients than HD so that only patients with NSCLC had greater than 20% of these cells in the peripheral blood (**Fig. 1B**). The intensity of TIE2 expression was significantly higher in M-MDSCs from NSCLC patients than on those from healthy subjects (**Fig. 1C**). To confirm the overexpression of TIE2 on patients' M-MDSCs, we quantified TIE2 mRNA expression in sorted HLA-DR$^-$ CD14$^+$ M-MDSCs (corresponding to M-MDSC 1) and showed that M-MDSC1 from patients express 1.5–2 times more TIE2 mRNA than those from HD. In addition, TIE2 receptor density on M-MDSCs measured by Quantibrite assay also showed that the number of TIE2 receptors on M-MDSCs was higher in patients with NSCLC compared with HD especially on M-MDSC 4 and M-MDSC 5, the more phenotypically characterized subsets (Supplementary Fig. S1).

Unsupervised hierarchical clustering analysis showed that these circulating TIE2$^+$ M-MDSCs overlapped in patients with NSCLC and segregated in three categories of low, intermediate, and high TIE2$^+$ M-MDSC expression (**Fig. 1D**). Healthy subjects presented low and intermediate profiles but the cluster containing high percentages of TIE2$^+$ MDSC was lacking (Supplementary Fig. S1). Thus, overexpression of TIE2 represents a feature of circulating M-MDSCs in patients with NSCLC.

Next, we investigated the relationship between ANGPT2, the ligand of TIE2, and M-MSDC accumulation. In line with the literature (25, 26), concentration of ANGPT2 in serum was higher in patients with NSCLC than in healthy volunteers; amounts were significantly elevated in metastatic patients (**Fig. 2A** and **B**). As shown in **Fig. 2C**, patients segregated into three distinct profiles: those with ANGPT2^{low}/TIE2^{low} M-MDSCs, ANGPT2^{low}/TIE2^{high} M-MDSCs, or ANGPT2^{high}/TIE2^{high} M-MDSCs. Upregulation of the ANGPT2^{high}/TIE2^{high} M-MDSC signature characterized patients with metastatic disease (**Fig. 2C** and **D**). These observations suggest that ANGPT2 might be involved in TIE2$^+$ M-MDSC expansion in advanced stages of NSCLC.

ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC environment impairs TAA-specific T-cell response

Antitumor T cells are a target for MDSCs in the tumor microenvironment (10, 11). Therefore, we investigated the impact of the ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC axis on preexisting T-cell responses against TAA in patients. For this purpose, we evaluated blood T-cell reactivity against two TAAs, NY-ESO-1, and telomerase (TERT), by IFNγ ELISpot assay. The proportion of patients displaying preexisting T-cell responses against either TERT or NY-ESO-1 averaged about 35% in this cohort (**Fig. 3A**). In contrast, we observed that concentration of ANGPT2 was significantly lower in patients exhibiting functional anti-TAA T-cell responses, and mainly in patients with both TERT and NY-ESO-1–specific T cells (**Fig. 3B** and **C**). Similar results were obtained using a third TAA model, Wilms tumor-1 (WT1; Supplementary Fig. S2). When ANGPT2 serum concentrations increased, the percentage of patients responding against TAAs decreased, dropping down to 4% in patients exhibiting concurrent T-cell responses against TERT and NY-ESO-1 (**Fig. 3D** and **E**). No relationship was found between ANGPT2 serum concentrations and antiviral T-cell responses, which were concurrently measured in all patients (**Fig. 3F**).

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

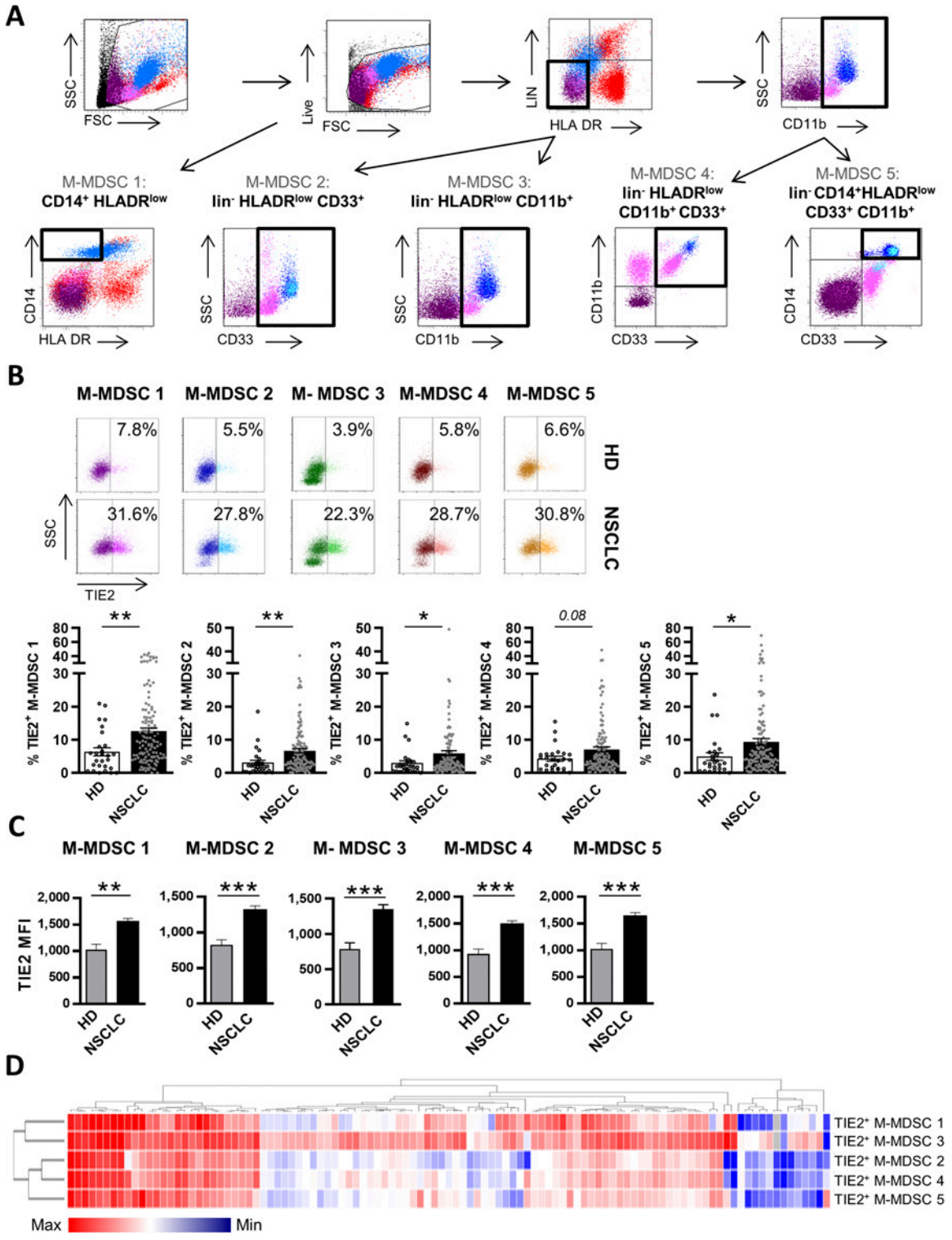


Figure 1.

Distribution of five phenotypes of circulating TIE2-expressing M-MDSCs in NSCLC versus healthy subjects. **A,** Flow cytometry gating strategies of five phenotypes of M-MDSCs from peripheral blood are shown. **B,** Top, representative plot of TIE2$^+$ M-MDSCs from 1 patient with NSCLC versus 1 HD; bottom, percentages of TIE2$^+$ cells in each phenotype of M-MDSCs from patients ($n = 122$) and HDs ($n = 34$; Mann–Whitney). **C,** Mean fluorescence intensity (MFI) of TIE2 expression in each phenotype of M-MDSCs. **D,** Unsupervised hierarchical clustering of the percentages of the five phenotypes of TIE2$^+$ M-MDSCs from patients ($n = 122$). Red and blue squares represent high and low percentages, respectively (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$).

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

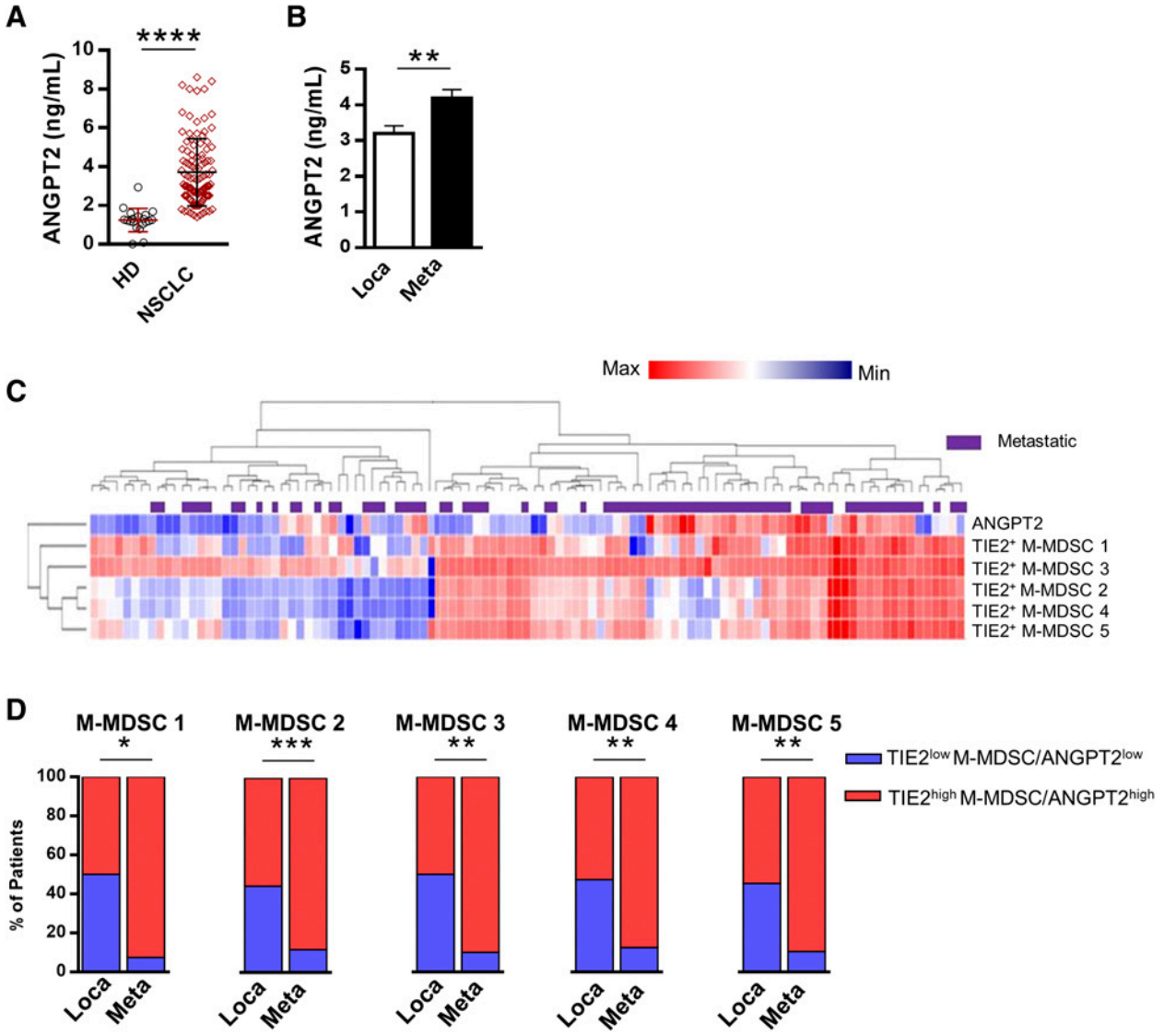


Figure 2.

Association between circulating rates of TIE2$^+$ M-MDSCs and ANGPT2 serum concentration. **A,** ANGPT2 serum concentration in patients with NSCLC ($n = 107$) and in HDs ($n = 20$) by ELISA assay (Mann–Whitney). **B,** Serum concentration of ANGPT2 in localized (Loca; $n = 52$) versus metastatic patients (Meta; $n = 55$; Mann–Whitney). **C,** Unsupervised hierarchical clustering of ANGPT2 serum concentration and percentages of TIE2$^+$ M-MDSCs in patients with NSCLC. Red and blue squares represent high and low percentages, respectively ($n = 107$). Metastatic patients are identified with purple squares. **D,** Frequency of patients with ANGPT2^{low}/TIE2^{low} M-MDSCs and ANGPT2^{high}/TIE2^{high} M-MDSC signature according to localized (Loca) versus metastatic (Meta) NSCLC for the five phenotypes of M-MDSCs (χ^2; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Next, we addressed the immunomodulatory effect of ANGPT2 against anti-TAA T-cell responses *in vitro*. To this end, we selected patients with untreated metastatic NSCLC presenting high percentages of TIE2-expressing M-MDSCs and cultured their PBMCs with TERT or NY-ESO-1–derived peptides in the presence or absence of exogenous ANGPT2 (**Fig. 4A**). Addition of recombinant ANGPT2 during *in vitro* stimulation abolished IFNγ production in response to TAAs (**Fig. 4B** and **C**; Supplementary Table S3). This result was confirmed in melanoma and ovarian cancers (Supplementary Fig. S3).

To assess whether this inhibitory effect involved TIE2$^+$ M-MDSCs, we added GW3965 LXR agonist to inactivate M-MDSCs during *in vitro* stimulation. LXR agonists selectively deplete MDSCs both *in vitro* and *in vivo* (27). We showed that the ANGPT2-inhibitory effect was impaired when MDSCs were inactivated by the addition of the GW3965 LXR agonist (**Fig. 4D** and **E**). To further evaluate the involvement of TIE2$^+$ M-MDSCs in anti-TAA T-cell inhibition, we removed these cells before blood lymphocyte stimulation with TAA-derived peptides. Because TIE2 is mainly expressed on CD11b$^+$ cells in peripheral blood, CD11b microbeads were used for TIE2$^+$ M-MDSC depletion (**Fig. 4F**). We found that removal of TIE2-expressing M-MDSCs before *in vitro* stimulation restored or significantly increased anti-TAA T-cell responses in 6 of 13 patients with untreated metastatic NSCLC (**Fig. 4G**). On the other hand, we

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

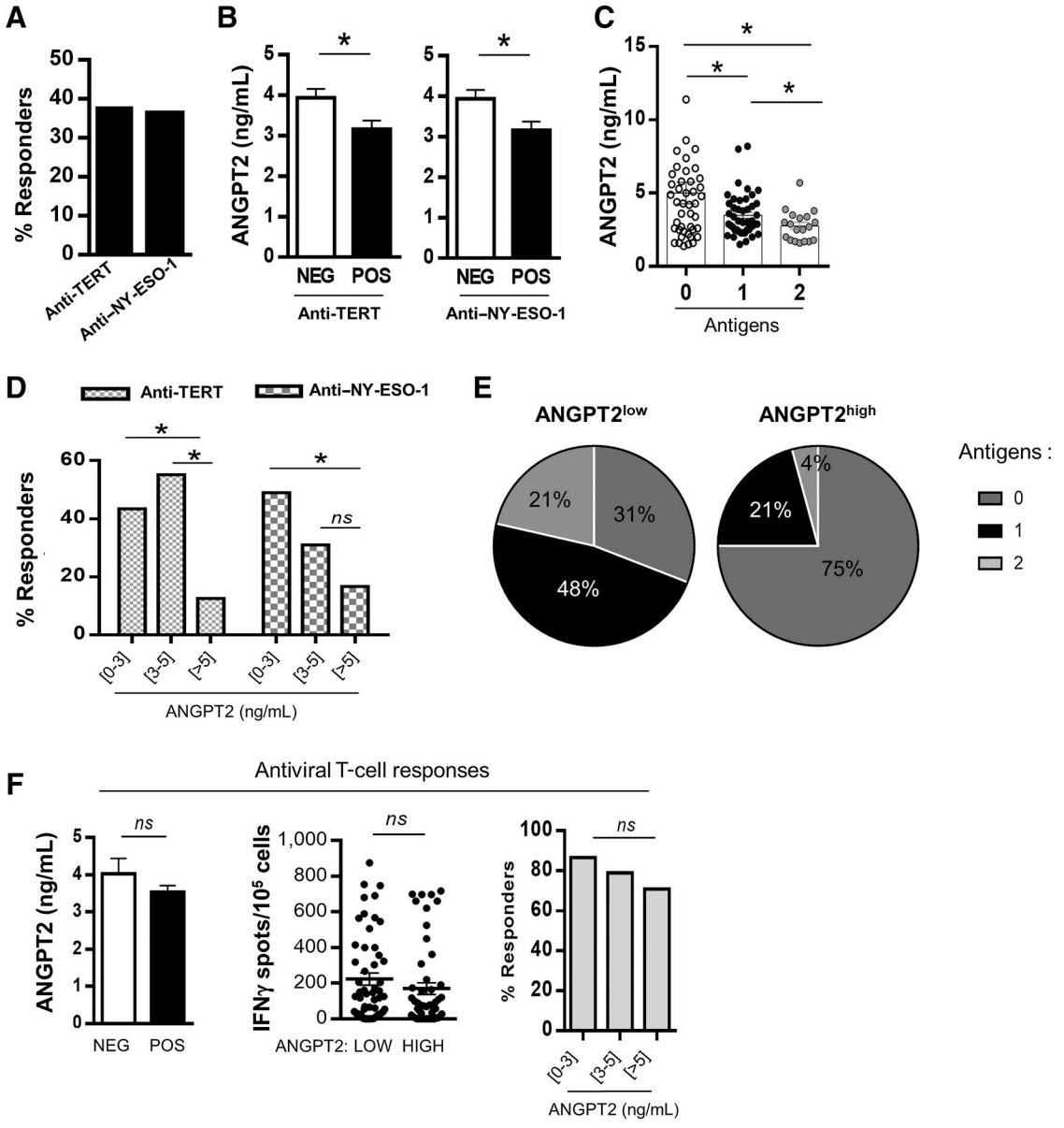


Figure 3.

Correlation between ANGPT2 axis and preexisting T-cell responses against TAAs in NSCLC. **A,** Frequency of patients presenting spontaneous T-cell responses against tumor antigen TERT or NY-ESO-1 measured by IFNγ ELISpot ($n = 100$). **B,** ANGPT2 concentration according to the anti-TAA T-cell responses: left, anti-TERT T-cell response negative (NEG, $n = 63$) or positive (POS, $n = 41$), right anti–NY-ESO-1 T-cell response negative (NEG, $n = 62$) or positive (POS, $n = 40$; Mann–Whitney). **C,** Serum concentration of ANGPT2 in patients responding to 0, 1, or 2 TAAs (TERT + NY-ESO-1; Mann–Whitney). **D,** Frequency of anti-TERT and anti–NY-ESO-1 responders according to increasing concentration of ANGPT2 (χ^2). **E,** Distribution of anti-TAA immune responders in the group of patients with ANGPT2^{low} ($n = 51$) versus ANGPT2^{high} ($n = 56$) signature. **F,** Association between ANGPT2 serum level and antivirus T-cell responses (CEF) measured by IFNγ ELISpot: left, antiviral responses negative (NEG, $n = 21$) and positive (POS, $n = 78$); middle, distribution of antiviral T cells shown as number of IFNγ spots in ANGPT2^{low} ($n = 48$) versus ANGPT2^{high} ($n = 51$) group; right, frequency of antiviral responders according to increasing ANGPT2 serum concentration ($n = 99$; Mann–Whitney). For **B–D**, *, $P < 0.05$. For **D** and **F**, ns, not significant.

detected in the sera of patients exhibiting an ANGPT2^{high}/TIE2^{high} M-MDSC signature, high concentrations of immune-suppressive cytokines such as TGFβ, VEGF-A, IL6, and PGE2, but not IL10 (Supplementary Fig. S4). Collectively, our results indicate that the activated ANGPT2/TIE2^{+} M-MDSC axis inhibits T-cell responses directed against TAAs.

ANGPT2 sensitizes TIE2^{+} M-MDSCs to suppress TAA-specific T-cell responses

To scrutinize the interaction between the ANGPT2/TIE2^{+} M-MDSC axis and the anti-TAA T-cell responses, we cocultured T cells and TIE2^{+} M-MDSCs. We selected HDs with low or high percentages of TIE2^{+} M-MDSCs and sorted HLA-DR^{-}CD14^{+}

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

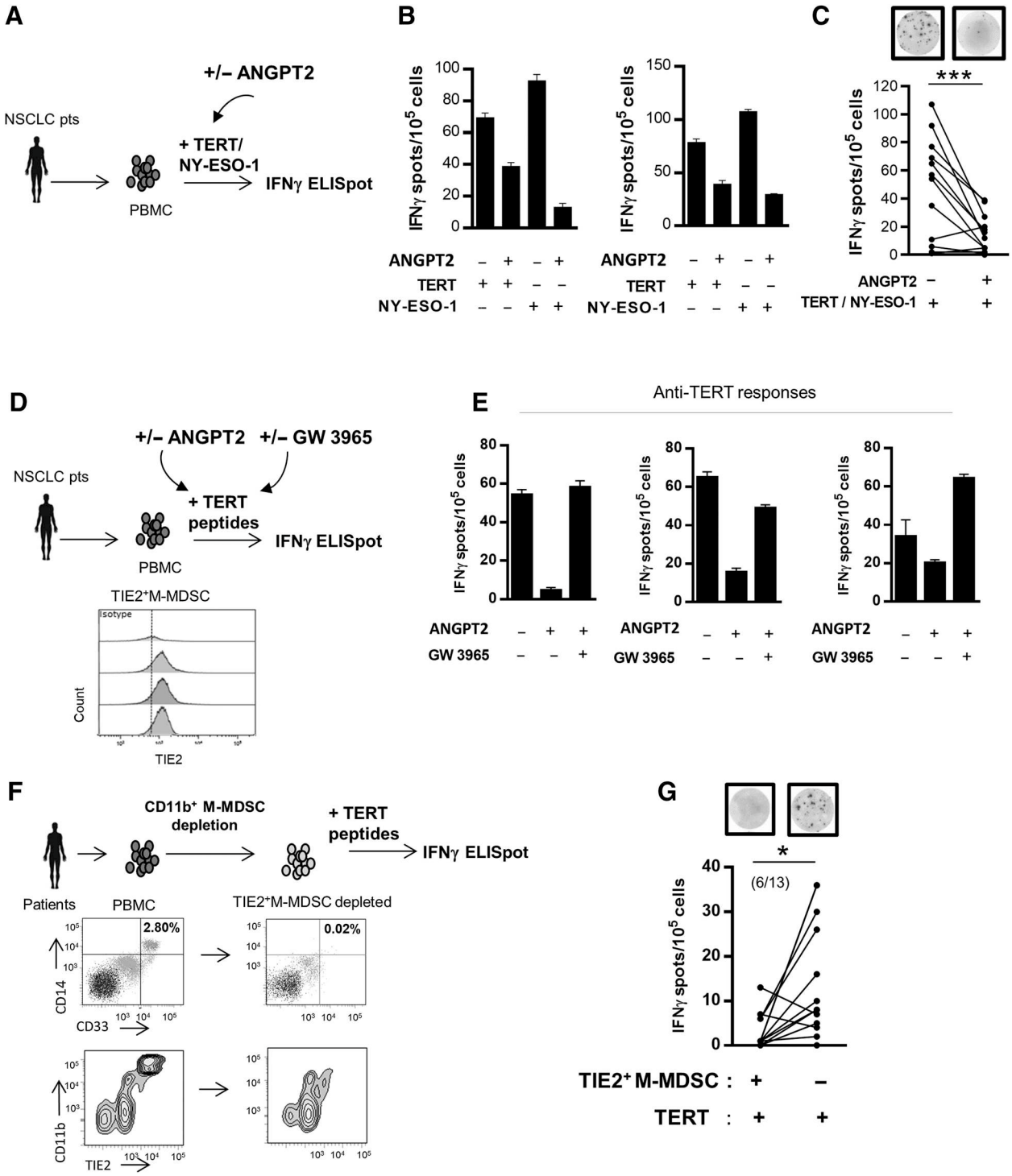


Figure 4.

TIE2$^+$ M-MDSCs mediate ANGPT2-inhibitory effect on tumor-reactive T cells. **A,** PBMCs from patients (pts) with untreated metastatic NSCLC with TIE2$^+$ M-MDSCs were cultured with TERT and/or NY-ESO-1–derived peptides in the presence or absence of ANGPT2 (300 ng/mL) for 6 days. Specific T-cell responses were measured by IFNγ ELISpot. **B,** Representative histograms from 2 of 13 patients evaluated. Error bars refer to technical triplicates. **C,** TAA-specific T-cell responses (directed against TERT and NY-ESO-1) in the presence or absence of ANGPT2 (Mann–Whitney; ***, $P < 0.001$). **D,** PBMCs from patients (pts) with NSCLC with TIE2$^+$ M-MDSCs were cultured with TERT-derived peptides with or without ANGPT2 (300 ng/mL) and with or without LXR agonist GW 3965. Anti-TERT response was assessed as above. **E,** Histograms from 3 representative patients are shown. Error bars refer to technical triplicates **F,** PBMCs depleted or not of TIE2$^+$ M-MDSCs using CD11b magnetic beads and cultured with tumor-derived peptides (TERT and NY-ESO-1). T-cell reactivity was assessed by IFNγ ELISpot as above. **G**, Anti-TAA T-cell responses without TIE2$^+$ M-MDSCs in patients. Data are representative of three independent experiments (*, $P < 0.05$).

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

M-MDSCs (referred to as phenotype 1) from their PBMCs according to a previously described method (28). Some of these sorted M-MDSC 1s were then preexposed to recombinant ANGPT2 before coculture with an anti-TERT $CD4^+$ T-cell clone (**Fig. 5**). This $CD4^+$ clone is a high avidity Th1-polarized $CD4^+$ clone reactive against TERT (22, 29) that did not express TIE2 even during coculture with M-MDSCs (**Fig. 5A**). As depicted in **Fig. 5B**, in the presence of $TIE2^{high}$ M-MDSCs, we observed a decrease of IFNγ and TNFα production by the $CD4^+$ clone. When $TIE2^+$ M-MDSCs were pretreated with ANGPT2, their ability to inhibit the IFNγ and TNFα production in response to cognate peptide doubled (**Fig. 5B** and **C**). In contrast, the effect of ANGPT2 on M-MDSCs was impaired in the context of low TIE2 expression. Recombinant ANGPT2 had no effect on the production of cytokines by the $CD4^+$ clone (**Fig. 5D–F**). Thus, an ANGPT2-rich environment increases the inhibitory functions of M-MDSCs overexpressing TIE2.

Active ANGPT2/$TIE2^+$ M-MDSC axis predicts poor clinical outcome

In this cohort of patients, median OS in advanced NSCLC previously treated with chemoradiation or chemotherapy was around 13 months. For the 5 advanced patients who received tyrosine kinase inhibitor, their median OS was 23 months. For patients with localized disease treated by surgery, median OS at 2 years was not reached. These observations support the clinical outcomes already reported in NSCLC (30).

In line of the literature (26, 31), we found that a higher amount of serum ANGPT2 was significantly associated with poor prognosis both in patients with localized and metastatic NSCLC ($P < 10^{-4}$; **Fig. 6A**).

Our results showed that high numbers of MDSCs of all $TIE2^+$ phenotypes negatively affected patients' OS, especially in metastatic NSCLC. The median OS was 9 months for patients with $TIE2^{high}$ M-MDSCs, as compared with 16 months for patients with $TIE2^{low}$ M-MDSCs (**Fig. 6B**; Supplementary Fig. S5). In contrast, when the association with clinical outcome was analyzed regardless of TIE2 expression, only high numbers of MDSCs with phenotypes of M-MDSC 1 and M-MDSC 5 were associated with poor prognosis (Supplementary Fig. S5).

Next, we addressed the clinical significance of the ANGPT2/$TIE2^+$ M-MDSC axis in this cohort. We found that patients exhibiting the $ANGPT2^{low}$/$TIE2^{low}$ M-MDSC signature in blood (who did not reach median OS) had better clinical outcomes than patients belonging to the group with $ANGPT2^{high}$/$TIE2^{high}$ M-MDSCs (median survival of 8 months; **Fig. 6C**). We also distinguished an intermediate prognostic group of patients (median OS around 14 months) with $ANGPT2^{high}$/$TIE2^{low}$ M-MDSC profile supporting the requirement of an active ANGPT2/$TIE2^+$ MDSC axis.

Collectively, our results highlight the ANGPT2/$TIE2^+$ M-MDSC signature as a participant in tumor immune evasion in which release of high amounts of ANGPT2 from the tumor microenvironment targets circulating $TIE2^{high}$ M-MDSCs and sensitizes them to suppress anti-TAA T cells (**Fig. 6D**).

Discussion

The presence of MDSCs with immunosuppressive activity is common in human cancers (10, 32). There is growing interest for monitoring circulating MDSCs in patients with cancer and efforts have been made to harmonize the parameters that characterize these heterogeneous immune-suppressive cells (24, 33). Here, we analyzed in NSCLC five phenotypes of circulating M-MDSCs and studied their expression of TIE2, the ANGPT2 receptor. A subset of TIE2-expressing monocytes/macrophages called TEMs has been described in various human cancers (15, 16, 18). In this report, we found that all the five phenotypes of M-MDSCs studied overexpressed TIE2 and overlapped both in healthy subjects and patients with NSCLC. Patients exhibited higher circulating rates of $TIE2^+$ M-MDSCs as compared with healthy individuals. The frequency of $TIE2^+$ M-MDSCs was related to the amount of the ligand ANGPT2 in peripheral blood. The $ANGPT2^{high}$/$TIE2^{high}$ M-MDSC signature was preferentially detected in metastatic patients, correlating tumor dissemination with accumulation of these cells.

We showed that the prognostic value of M-MDSCs with or without TIE2 expression appeared different in NSCLC. Without TIE2 expression, only the phenotypes M-MDSC 1 and 5 affected NSCLC patients' survival, in accordance with previous findings (34, 35). However, with TIE2 expression, all phenotypes of M-MDSCs were associated with poor prognosis, especially in metastatic patients. These observations suggest that TIE2 expression could worsen the prognostic value of circulating M-MDSCs. Indeed, high percentages of TEMs in blood or in the tumor microenvironment are associated to a poor prognosis in various patients with cancer (36, 37). Thus, we believe that overexpression of TIE2 characterizes circulating M-MDSCs regardless of the expression of other markers used for M-MDSC characterization (24).

By combining the percentages of $TIE2^+$ M-MDSCs with ANGPT2 concentrations, we stratified patients into three prognostic groups (best, intermediate, and poor). Patients in the group with the best prognosis were characterized by the $ANGPT2^{low}$/$TIE2^{low}$ M-MDSC profile and did not reach median OS. Patients in the group with the worst prognosis were characterized by the $ANGPT2^{high}$/$TIE2^{high}$ M-MDSC profile and has median OS ≈ 8 months. Patients in the group characterized by intermediate survival exhibited the $ANGPT2^{high}$/$TIE2^{low}$ M-MDSC signature. We suggest that ANGPT2 may enhance the protumor function of $TIE2^+$ M-MDSCs. Thus, combining both ANGPT2 concentration and $TIE2^+$ M-MDSC frequency may predict patient survival in NSCLC.

The ANGPT2/TIE2 axis is involved in blood vessel maturation and has been associated with progression and poor prognosis in various cancers, including lung cancer (17, 18, 25, 32). Because ANGPT2 stimulates the immunosuppressive functions of TEMs (16, 18, 19, 38), we proposed that the poor prognosis associated with high signature of ANGPT2/$TIE2^+$ M-MDSCs in blood could be related to the inherent inhibition of antitumor T-cell immunity. To test this assumption, we studied the effect of the ANGPT2/$TIE2^+$ M-MDSC axis on preexisting T-cell responses against three shared TAAs: NY-ESO-1, TERT, and WT-1 (39). Our results revealed that the presence of an ANGPT2/$TIE2^+$ M-MDSC–rich blood environment was associated with an impaired T-cell response against TAAs in patients with NSCLC.

Previous work shows that T-cell responses against certain TAAs in peripheral blood may influence cancer outcome. For instance, we and others have reported that increased numbers, in peripheral blood, of IFNγ-secreting T cells targeted to NY-ESO-1 and TERT was associated with good prognosis (40, 41), suggesting that a preexisting antitumor Th1 signature in blood may confer tumor protection. In this study, we found that patients exhibiting T-cell responses against all the three TAAs simultaneously had a better prognosis. Hence, one explanation of the poor prognosis associated with the signature of excess ANGPT2/$TIE2^+$ M-MDSCs may be related to the inhibitory effect exerted by this signature against TAA-specific T-cell immunity. Our *in vitro* experiments confirmed this assumption and showed the ability of ANGPT2 to promote inhibition of TAA-specific T cells via $TIE2^+$ M-MDSCs.

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

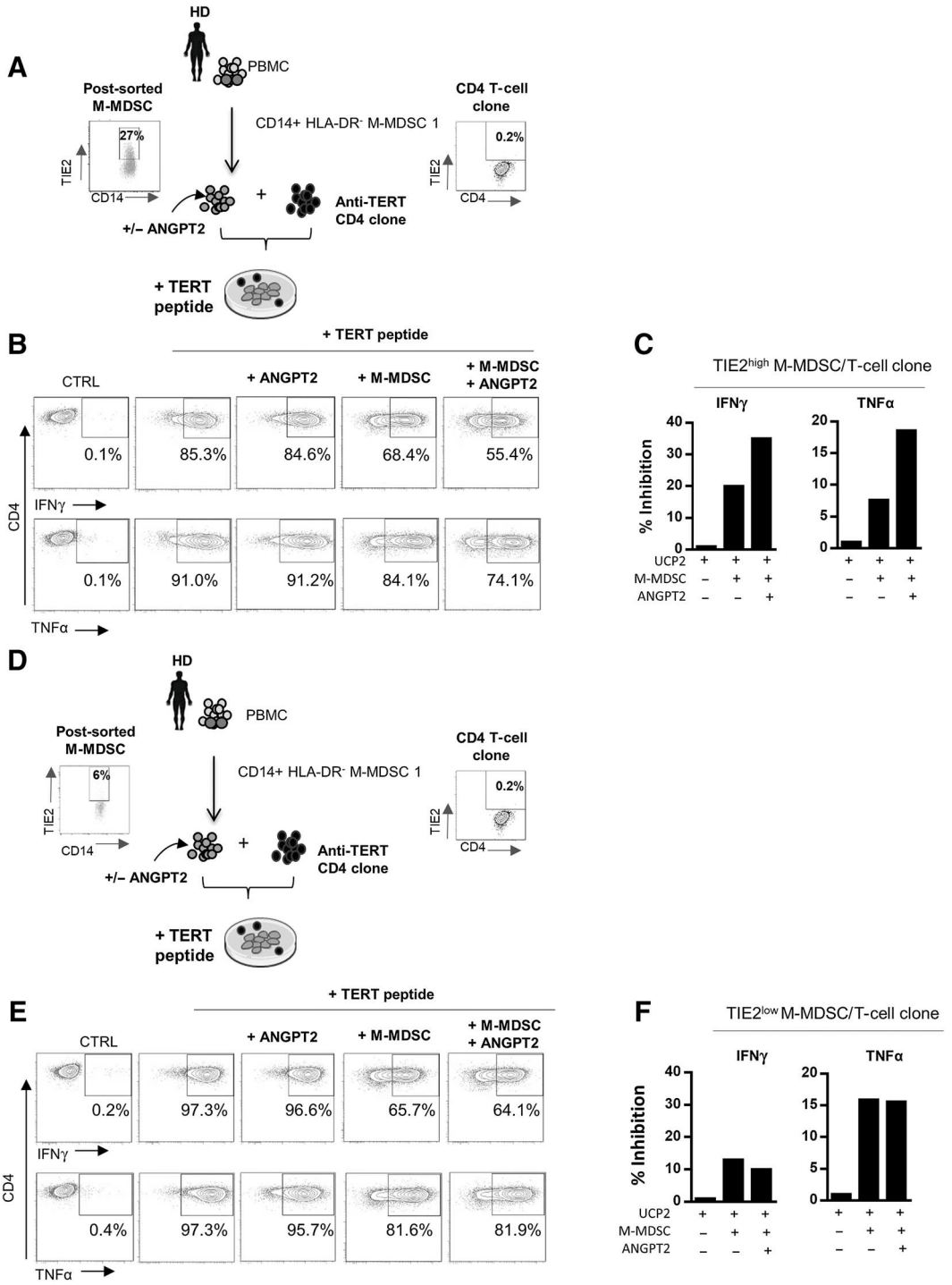


Figure 5.

ANGPT2 exposure increases suppressive function of TIE2^{+} M-MDSCs on TERT-specific CD4 Th1 clone. **A,** HLA DR^{-} CD14^{+} M-MDSCs were magnetically sorted from HD blood and analyzed for TIE2 expression. Postsorted MDSCs with a high percentage of TIE2 were incubated for 3 hours in the presence of recombinant ANGPT2 and cocultured with TERT-specific CD4^{+} Th1 clone with or without the cognate TERT peptide for an additional 15 hours. The clone reactivity was assessed by intracellular cytokine staining. **B,** Representative plots showing the percentage of IFNγ- and TNFα-secreting T cells in the context of TIE2^{high} M-MDSCs. **C,** Histograms show inhibition percentages of TERT-specific Th1 clone. **D,** HLA DR^{-} CD14^{+} M-MDSCs were magnetically sorted from HD blood and analyzed for TIE2 expression. Postsorted MDSCs with a low percentage of TIE2 were incubated for 3 hours in the presence of recombinant ANGPT2 and cocultured with TERT-specific CD4^{+} Th1 clone with or without the cognate TERT peptide for an additional 15 hours. The clone reactivity was assessed by intracellular cytokine staining. **E,** Representative plots showing the percentage of IFNγ- and TNFα-secreting T cells in the context of TIE2^{low} M-MDSCs. **F,** Histograms show inhibition percentages of TERT-specific Th1 clone. Data are representative of four independent experiments.

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

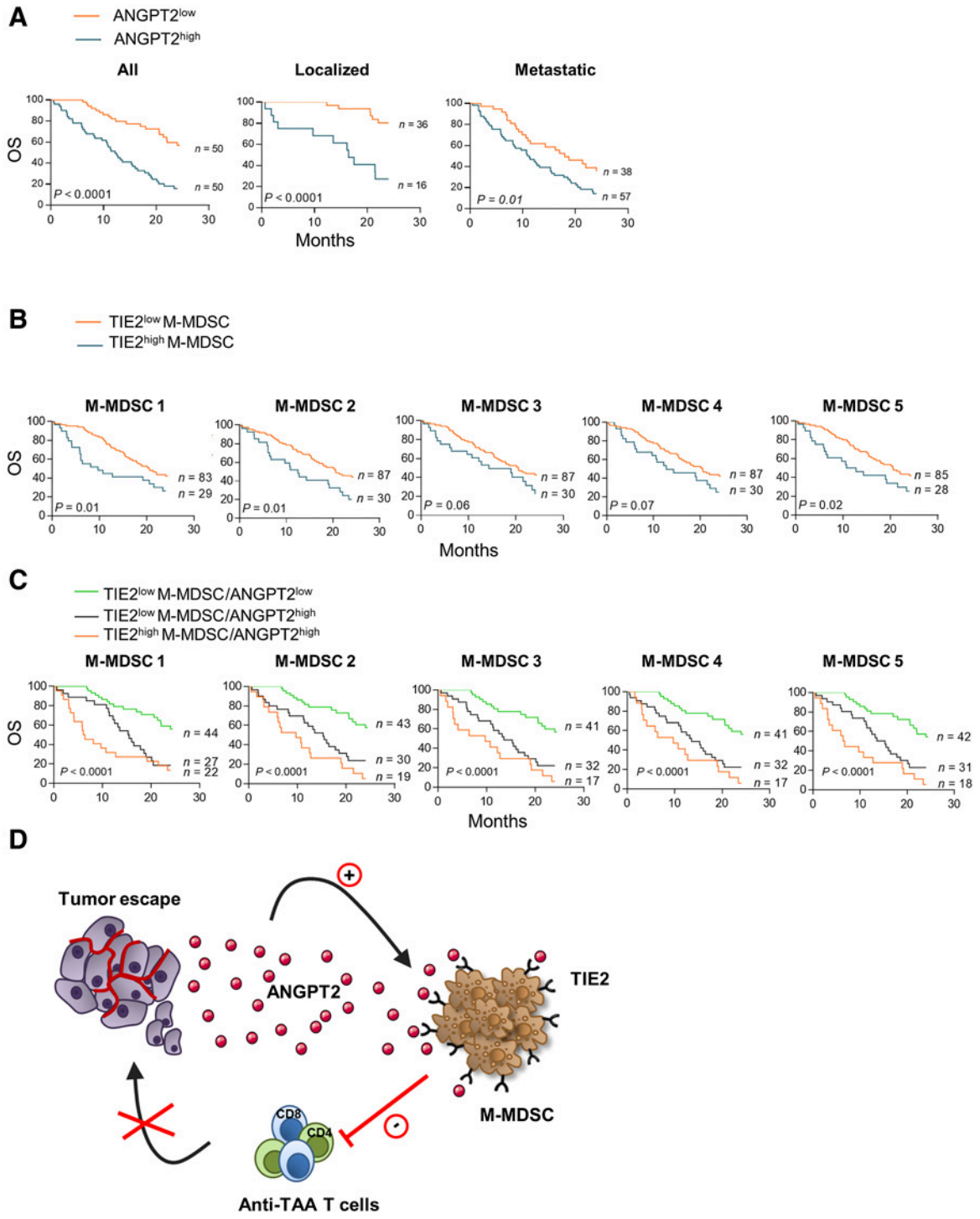


Figure 6.

Prognostic value of ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC signature in NSCLC. **A,** Association between serum concentration of ANGPT2 and OS. Kaplan–Meier curves according to the concentration of ANGPT2 in overall population, and in localized and metastatic stages. Thresholds were determined according to the upper quartile of the median of serum ANGPT2 in patients (3 ng/mL; log-rank test). **B,** Association between the percentages of TIE2$^+$ M-MDSCs and OS. Kaplan–Meier curves according to the percentages of TIE2$^+$ M-MDSCs in overall population. TIE2$^+$ M-MDSC$^{low/high}$ status was determined according to the upper quartile of the median rate of each TIE2$^+$ M-MDSC phenotype (M-MDSC1: 16.7%, M-MDSC2: 6.7%, M-MDSC3: 5.9, M-MDSC4: 7.1%, and M-MDSC5: 9.4%; log-rank test). **C,** Kaplan–Meier curves according to the ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC blood signature in overall population (log-rank test). **D,** Model of immune evasion associated with upregulation of ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC blood signature: ANGPT2 release from tumor microenvironment activates TIE2-expressing M-MDSCs and sensitizes them to efficiently suppress adaptive antitumor T-cell immunity.

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

The immunomodulatory roles in human cancers of ANGPT2 have been less studied than those of VEGF. In mouse models, ANGPT2 promotes recruitment of immune-suppressive cells such as MDSCs and regulatory T cells (Treg), as well as TEMs (19, 42). ANGPT2 also facilitates the migration of immune cells out of the vasculature and into the tumor microenvironment (43). Human TEMs exposed to ANGPT2 can promote Treg expansion via IL10-dependent mechanisms (19). In this study, we observed that an ANGPT2-rich blood environment was related to increased concentrations of immunosuppressive factors such as VEGF, IL6, TGFβ, and PGE2, which could explain the inhibition of T-cell responses against TAA (21, 44–46). However, further studies are needed to determine whether the suppressive mechanisms of the ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC axis depends on direct cell–cell contact or soluble mediators (11).

M-MDSC frequency could be used to predict response to anti–PD-1/PD-L1 therapies (47–49). A report in patients with melanoma showed that ANGPT2 could represent a predictive biomarker for anti–PD-1 treatment (50). Here, by linking MDSC and ANGPT2 through the tyrosine kinase receptor TIE2, we raise the question of the involvement of ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC immunosuppressive signature in the resistance to immune checkpoint inhibitors. Whether this signature is also involved in the resistance to treatments such as chemotherapy and radiation remains to be explored.

In summary, our results indicate that ANGPT2/TIE2 axis activation can potentiate the inhibitory activity exerted by M-MDSCs against antitumor T cells. This study supports the use of TIE2 expression as a phenotypical feature to identify suppressive M-MDSCs and also prompts us to explore the ANGPT2/TIE2$^+$ M-MDSC axis as biomarker for cancer immunotherapy.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: E. Lauret Marie Joseph, O. Adotévi
Development of methodology: E. Lauret Marie Joseph, C. Laheurte, K. Asgarov, A. Bouard, M. Dosset, O. Adotévi
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): E. Lauret Marie Joseph, L. Boullerot, O. Adotévi
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): E. Lauret Marie Joseph, C. Laheurte, M. Jary, M. Dosset
Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. Lauret Marie Joseph, C. Laheurte, M. Jary, L. Rangan, M. Dosset, O. Adotévi
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): E. Lauret Marie Joseph, E. Gravelin, A. Bouard, L. Rangan, C. Borg
Study supervision: O. Adotévi

Acknowledgments

We sincerely thank all the patients, the medical doctors, and the nurses from the Thoracic Oncologic Department of University Hospital of Besançon and European Georges Pompidou hospital in Paris for their contributions. The authors also thank the Biomonitoring platform of CIC-1431 and Pr. De Carvalho Marcelo for their technical support. This work was supported by grants from Fonds de Dotation de Recherche en Santé Respiratoire, La Ligue Contre le Cancer, the Conseil Regional de Franche-Comte, and Canceropôle Grand Est.

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

Received May 3, 2019; revised October 4, 2019; accepted December 18, 2019; published first December 23, 2019.

References

1. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. Nat Rev Cancer 2013;13:739–52.
2. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. J Clin Invest 2015;125:3356–64.
3. Condamine T, Ramachandran I, Youn J-I, Gabrilovich DI. Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. Annu Rev Med 2015;66:97–110.
4. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. Ann N Y Acad Sci 2014;1319:47–65.
5. Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. Cancer Immunol Res 2017;5:3–8.
6. Diaz-Montero CM, Finke J, Montero AJ. Myeloid derived suppressor cells in cancer: therapeutic, predictive, and prognostic implications. Semin Oncol 2014;41:174–84.
7. Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M, Rébé C, Derangère V, Chevriaux A, et al. Accumulation of MDSC and Th17 cells in patients with metastatic colorectal cancer predicts the efficacy of a FOLFOX-bevacizumab drug treatment regimen. Cancer Res 2016;76:5241–52.
8. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. Cancer Immunol Immunother 2010;59:1593–600.
9. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. Trends Immunol 2016;37:208–20.
10. Ostrand-Rosenberg S, Fenselau C. Myeloid-derived suppressor cells: immune-suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. J Immunol 2018;200:422–31.
11. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. Nat Immunol 2018;19:108–19.
12. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:165–77.
13. Thurston G, Daly C. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-tie signaling pathway. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2:a006550.
14. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi LS, Politi LS, Sampaolesi M, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. Cancer Cell 2005;8:211–26.
15. Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. J Immunol 2007;178:7405–11.
16. Turrini R, Pabois A, Xenarios I, Coukos G, Delaloye JF, Doucey MA. TIE-2 expressing monocytes in human cancers. Oncoimmunology 2017;6:e1303585.
17. Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. Cancer Res 2007;67:8429–32.
18. Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, De Palma M, Patel S, Urbich C, et al. Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. Cancer Res 2010;70:5270–80.
19. Coffelt SB, Chen Y-Y, Muthana M, Welford AF, Tal AO, Scholz A, et al. Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. J Immunol 2011;186:4183–90.
20. De Palma M, Naldini L. Angiopoietin-2 TIEs up macrophages in tumor angiogenesis. Clin Cancer Res 2011;17:5226–32.
21. Lapeyre-Prost A, Terme M, Pernot S, Pointet A-L, Voron T, Tartour E, et al. Immunomodulatory activity of VEGF in cancer. Int Rev Cell Mol Biol 2017;330:295–342.
22. Laheurte C, Galaine J, Beziaud L, Dosset M, Kerzerho J, Jacquemard C, et al. Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4(+) Th1 responses against telomerase in cancer patients. Oncoimmunology 2016;5:e1137416.

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst December 23, 2019; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0326

23. Godet Y, Fabre E, Dosset M, Lamuraglia M, Levionnois E, Ravel P, et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. Clin Cancer Res 2012; 18:2943–53.
24. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. Nat Commun 2016;7:12150.
25. Jary M, Vernerey D, Lecomte T, Dobi E, Ghiringhelli F, Monnien F, et al. Prognostic value of angiopoietin-2 for death risk stratification in patients with metastatic colorectal carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2015;24: 603–12.
26. Helfrich I, Edler L, Sucker A, Thomas M, Christian S, Schadendorf D, et al. Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. Clin Cancer Res 2009;15:1384–92.
27. Tavazoie MF, Pollack I, Tanqueco R, Ostendorf BN, Reis BS, Gonsalves FC, et al. LXR/ApoE activation restricts innate immune suppression in cancer. Cell 2018; 172:825–840.
28. Solito S, Pinton L, De Sanctis F, Ugel S, Bronte V, Mandruzzato S, et al. Methods to measure MDSC immune suppressive activity in vitro and in vivo. Curr Protoc Immunol 2019;124:e61.
29. Galaine J, Kellermann G, Guillaume Y, Boidot R, Picard E, Loyon R, et al. Heparan sulfate proteoglycans promote telomerase internalization and MHC class II presentation on dendritic cells. J Immunol 2016;197: 1597–608.
30. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. Mayo Clin Proc 2008;83: 584–94.
31. Xuan Z-X, Zhang S, Yuan S-J, Wang W, Yu J. Prognostic value of angiopoietin-2 in non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. World J Surg Oncol 2016; 14:237.
32. Ostrand-Rosenberg S. Tolerance and immune suppression in the tumor microenvironment. Cell Immunol 2016;299:23–9.
33. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. Cancer Immunol Immunother 2016;65:161–9.
34. Feng P-H, Lee K-Y, Chang Y-L, Chan Y-F, Kuo L-W, Lin T-Y, et al. CD14(+) S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. Am J Respir Crit Care Med 2012; 186:1025–36.
35. Vetsika E-K, Koinis F, Gioulbasani M, Aggouraki D, Koutoulaki A, Skalidaki E, et al. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. J Immunol Res 2014;2014:659294.
36. Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, et al. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlates with angiogenesis. Hepatology 2013;57:1416–25.
37. Atanasov G, Pötner C, Aust G, Schierle K, Dietel C, Benzing C, et al. TIE2-expressing monocytes and M2-polarized macrophages impact survival and correlate with angiogenesis in adenocarcinoma of the pancreas. Oncotarget 2018;9:29715–26.
38. Ibberson M, Bron S, Guex N, Faes-van't Hull E, Ifticene-Treboux A, Henry L, et al. TIE-2 and VEGFR kinase activities drive immunosuppressive function of TIE-2-expressing monocytes in human breast tumors. Clin Cancer Res 2013;19: 3439–49.
39. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin Cancer Res 2009; 15:5323–37.
40. Weide B, Zelba H, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, Di Giacomo AM, et al. Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. J Clin Oncol 2012;30: 1835–41.
41. Laheurte C, Dosset M, Vernerey D, Boullerot L, Gaugler B, Gravelin E, et al. Distinct prognostic value of circulating anti-telomerase CD4 + Th1 immunity and exhausted PD-1 +/TIM-3 + T cells in lung cancer. Br J Cancer 2019;121: 405–16.
42. Scholz A, Lang V, Henschler R, Czabanka M, Vajkoczy P, Chavakis E, et al. Angiopoietin-2 promotes myeloid cell infiltration in a β_2-integrin-dependent manner. Blood 2011;118:5050–9.
43. Holopainen T, Saharinen P, D'Amico G, Lampinen A, Eklund L, Sormunen R, et al. Effects of angiopoietin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis. J Natl Cancer Inst 2012;104:461–75.
44. Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL6 in the tumor microenvironment. Semin Immunol 2014;26:38–47.
45. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J Immunol 2012;188:21–8.
46. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. Trends Immunol 2010;31: 220–7.
47. Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, et al. Myeloid cells and related chronic inflammatory factors as novel predictive markers in melanoma treatment with ipilimumab. Clin Cancer Res 2015;21: 5453–9.
48. Huber V, Vallacchi V, Fleming V, Hu X, Cova A, Dugo M, et al. Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. J Clin Invest 2018;128:5505–16.
49. Limagne E, Richard C, Thibaudin M, Fumet J-D, Truntzer C, Lagrange A, et al. Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. Oncoimmunology 2019;8: e1564505.
50. Wu X, Giobbie-Hurder A, Liao X, Connelly C, Connolly EM, Li J, et al. Angiopoietin-2 as a biomarker and target for immune checkpoint therapy. Cancer Immunol Res. 2017;5:17–28.

Downloaded from cancerimmunolres.aacrjournals.org on January 31, 2020. © 2019 American Association for Cancer Research.

Supplementary Material and Figures

Supplementary Table S1 : Patients' main clinical characteristics

Patients with NSCLC	
Characteristics	**No. of pts (N=122)**
Age (mean, years)	69 (46-94)
Gender	
Male	82/122 (67%)
Female	40/122 (33%)
Smoking status	
Current and former	109/122 (89%)
Never	13/122 (11%)
Histologic subtype	
Non-squamous cell carcinoma	77/122 (63%)
Squamous cell carcinoma	27/122 (22%)
Other	18/122 (15%)
Stages	
I-II-III (Localized)	61/122 (50%)
IV (Metastatic)	61/122 (50%)
Treatment	
Surgery	39/122 (32%)
Chemoradiation	22/122 (18%)
Chemotherapy	56/122 (46%)
TKI	5/122 (4%)
Immunotherapy	0/122 (0%)

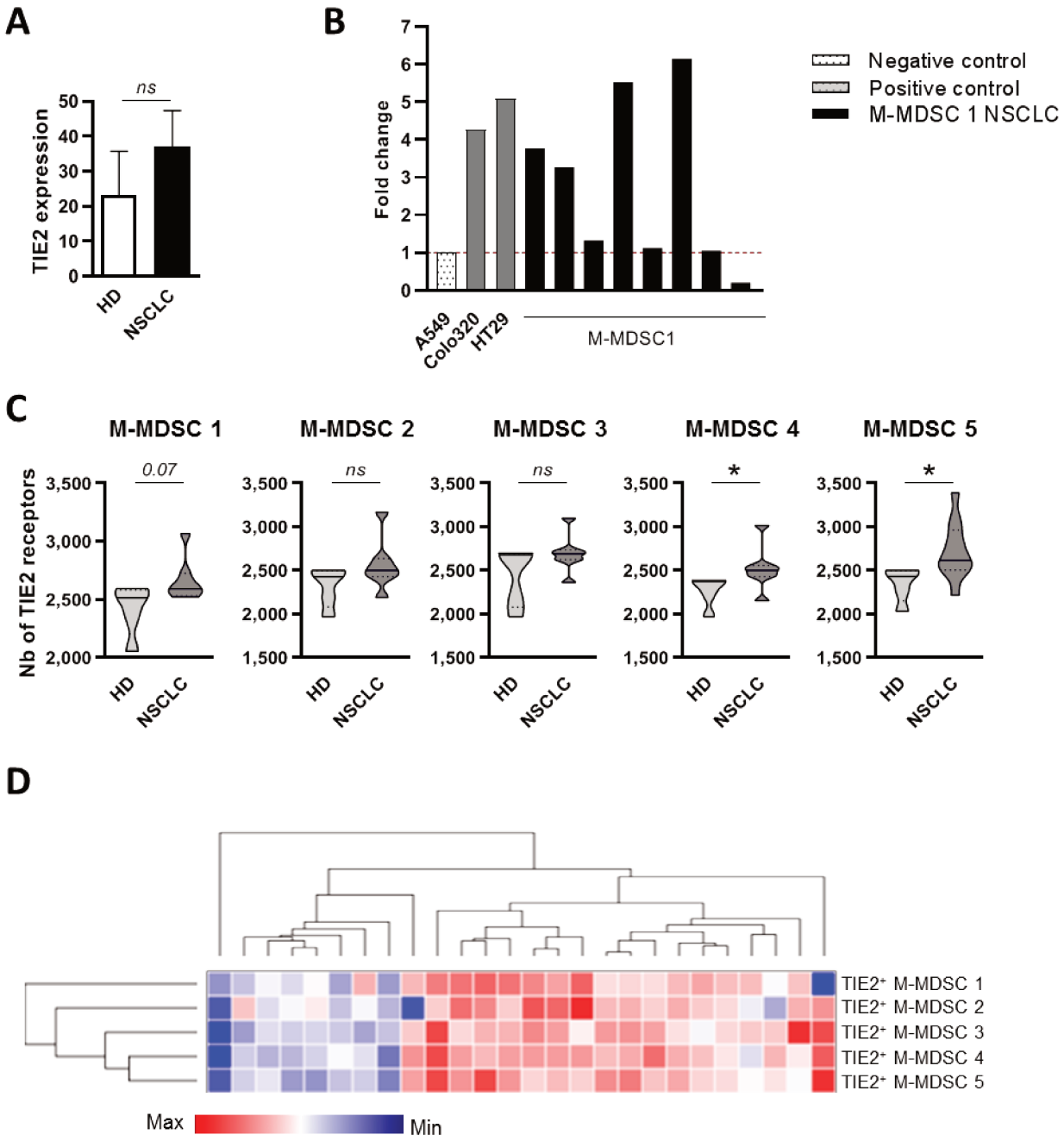
TKI: Tyrosine kinase inhibitor

Supplementary Table S3 : Effect of ANGPT2 on TAA-specific T cell responses.

Patient ID	Anti-TERT T cell responses (IFN-γ spots/10^5 cells)		Anti-NY-ESO1 T cell responses (IFN-γ spots/10^5 cells)	
	Medium	ANGPT2	Medium	ANGPT2
#1	54	5	nd	nd
#2	65	16	nd	nd
#3	57	18	nd	nd
#4	11	20	nd	nd
#5	35	5	nd	nd
#6	77	38	nd	nd
#7	nd	nd	107	27
#8	nd	nd	69	39
#9	nd	nd	92	12
#10	1	5	nd	nd
#11	6	1	nd	nd
#12	1	0	nd	nd
#13	2	2	nd	nd

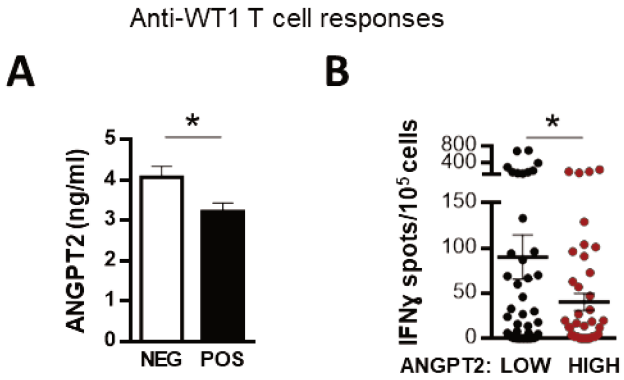
Supplementary Table S3: Effect of ANGPT2 on TAA-specific T cell responses. PBMC from untreated metastatic NSCLC patients with $TIE2^+$ M-MDSCs were cultured with tumor peptides TERT or NY-ESO-1 in the presence or absence of ANGPT2 (300ng/ml) for 6 days and specific T cell responses were measured by IFN-γ-ELISPOT. nd= not done.

Supplementary Figure S1 Related to Figure 1



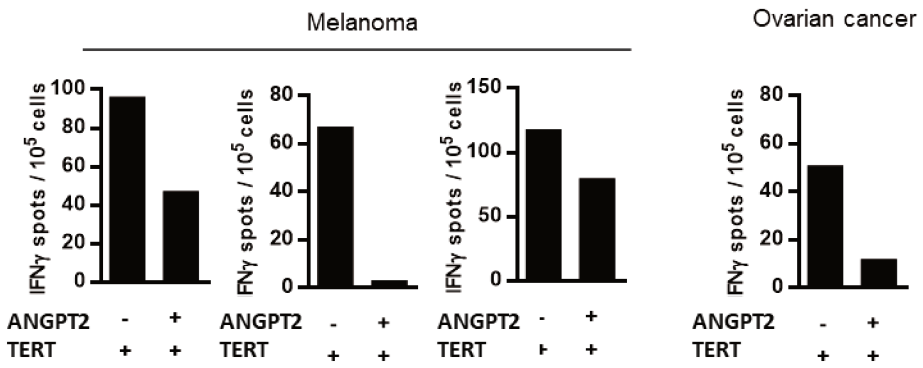
Supplementary Figure S1: Expression of TIE2 receptor by M-MDSCs. A, M-MDSC1 were sorted in NSCLC patients (n=8) and in HD (n=3). TIE2 mRNA expression of M-MDSC1 phenotype was assessed by qPCR (Mann&Whitney). **B**, Fold change of TIE2 mRNA expression by M-MDSC1 phenotype normalized with TIE2 negative A549 cells. Colo320 and HT29 cell lines were use as positive controls of TIE2 expression. The red line indicates the positivity threshold of TIE2 expression. **C,** Numbers of TIE2 receptors expressed by each M-MDSC phenotype in NSCLC patients (n=8) and in HD (n=5) (Mann&Whitney). **D,** Unsupervised hierarchical clustering of the percentages of the five TIE2+M-MDSC phenotypes in HD (n=26). Red and blue squares represent high and low percentages respectively.

Supplementary Figure S2 Related to Figure 3



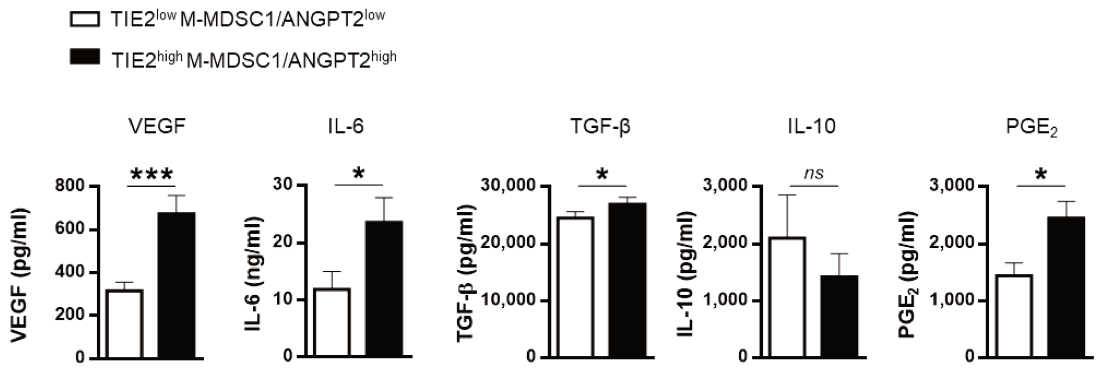
Supplementary Figure S2: Correlation between ANGPT2 and anti-WT1 T cell responses in NSCLC. A, ANGPT2 level according to anti-WT1 T cell responses, negative (NEG=51) and positive (POS=38). **B**, Number of WT-1 specific IFN-γ+ T cells according to ANGPT2 serum concentration (Mann&Whitney).

Supplementary Figure S3 Related to Figure 4



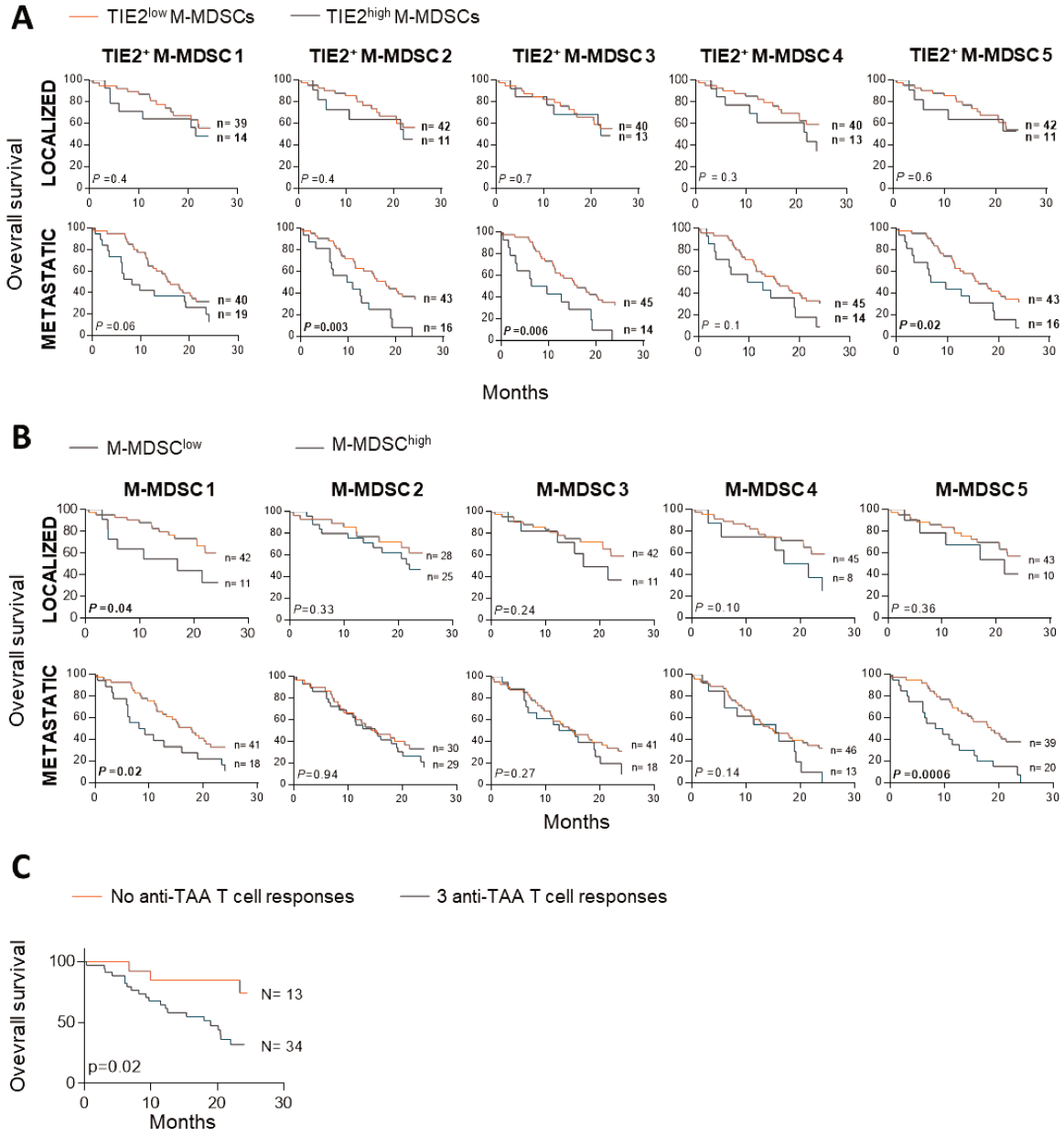
Supplementary Figure S3: ANGPT2 inhibitory effect against TERT-specific T cell responses. Anti-TERT T cell responses in presence or not of ANGPT2 in melanoma and ovarian cancer patients. Histograms represent number of TERT specific IFN-γ+ spots from triplicates.

Supplementary Figure S4 Related to Figure 4



Supplementary Figure S4: Blood cytokines according to the concentration of ANGPT2 and percentages of TIE2^{+} M-MDSCs. Concentrations of proangiogenic (VEGF-A), pro inflammatory (IL-6, PGE_2) and immune suppressive (IL-10, TGF-β), cytokines measured by CBA in the sera of NSCLC patients exhibiting TIE2^{low} M-MDSC1/ANGPT2^{low} versus TIE2^{high} M-MDSC1/ANGPT2^{high} signature in blood (Mann&Whitney).

Supplementary Figure S5 Related to Figure 6



Supplementary Figure S5: Prognostic value of circulating M-MDSC with or without TIE2 expression in NSCLC patients. A, Overall survival according to the level of TIE2^{+} M-MDSCs.**B,** Overall survival according to the level of M-MDSCs. **C,** Overall survival according to the presence or absence of T cell responses against 3 TAAs (TERT, NY-ESO1 and WT1) (Log rank test).

Supplementary Materials and Methods

List of monoclonal antibodies used for flow cytometry

ANTIBODIES	SOURCE	IDENTIFIER	RRID
APC alexa750 anti human CD19 (clone J3-119)	Beckman Coulter	Cat# A94681	na*
APC alexa750 anti human CD56 (clone N901)	Beckman Coulter	Cat# AB46024	na
APC alexa750 anti human CD3 (clone A94680)	Beckman Coulter	Cat# A94680	na
PE cy7 anti human CD11b (clone ICRF44)	Becton Dickinson	Cat# 557743	RRID:AB_396849
APC anti human CD33 (clone WM53)	Becton Dickinson	Cat# 551378	RRID:AB_398502
PE Mouse IgG1 isotype control (clone MOPC-21)	Becton Dickinson	Cat# 559320	RRID:AB_397218
PE cy7 Mouse IgG1 isotype control (clone MOPC-21)	Becton Dickinson	Cat# 557646	RRID:AB_396763
APC Mouse IgG1 isotype control (clone MOPC-21)	Becton Dickinson	Cat# 555751	RRID:AB_398613
APC anti human IFN-ɣ (clone B27)	Becton Dickinson	Cat# 554702	RRID:AB_398580
BV421 anti human CD4 (clone RPA-T4)	Becton Dickinson	Cat# 562424	RRID:AB_11154417
PE anti human TIE2 (clone 33.1 Ab33)	Biolegend	Cat# 334206	RRID:AB_2203207
PercP cy5.5 anti human HLA DR (clone L243)	Biolegend	Cat# 307630	RRID:AB_893567
BV421 anti human CD14 (clone HCD14)	Biolegend	Cat# 325627	RRID:AB_2561342
PE anti human TNF-α (clone MAb11)	Biolegend	Cat# 502909	RRID:AB_315261
APC Fire 750 anti human CD3 (clone UCHT1)	Biolegend	Cat# 300470	RRID:AB_2629689
eFluor506 Fixable Viability Dye	eBiosciences	Cat# 65-0866-14	na

*na=not available

The LXR (Liver X Receptor) agonist GW 3965 was purchased at Sigma (ref G6295, Sigma Aldrich).

TIE2 receptor quantification

To estimate the absolute number of TIE2 receptors expressed by each M-MDSC phenotype, PE-conjugated Quantibrite™ beads were used (BD Biosciences, France). Quantibrite™ tubes contain lyophilized beads conjugated with four determined concentrations of PE fluorochrome (low: 474 PE, medium-low: 5359, medium-high: 23843 and high: 62 336 PE molecules/beads). After reconstitution,

Quantibrite™ tubes were loaded on the FACS BD Canto II™ cytometer, FSC/SSC were adjusted and a calibration curve was plotted and fitted by a linear regression according to the manufacturer's instructions. Then, circulating M-MDSCs from 5 healthy volunteers and 8 NSCLC patients were stained as previously described and acquired. Mean fluorescence intensity values of TIE2 staining were converted in the number of TIE2 receptors per MDSC phenotype. Samples were acquired on a FACS BD Canto II™ (BD Biosciences) and analyzed with FACSDiva™ software (BD Biosciences).

Real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

Cells were collected in RLT buffer (Qiagen, France) and total mRNAs were extracted using RNAeasy mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, France). Total mRNAs were reverse-transcribed using the Taqman gene expression assay Hs00945142_m1 (Thermofisher, France) and the CFX96 real-Time PCR detection system (Biorad, France). Colo320 colon cancer cell line (RRID:CVCL_0219) and HT29 colorectal carcinoma cells (RRID:CVCL_0320) were used as positive controls of TIE2 expression. A549 lung carcinoma cells (RRID:CVCL_0023) were used as negative controls. All these cell lines were purchased at ATCC, cryopreserved and routinely tested for mycoplasma with Mycoalert™ detection kit (Lonza, France). Upon receipt, each cell line was expanded and stock vials were frozen. Each cell line was cultured no longer than one week before thawing a cryotube from the original stock.

Discussion – Perspectives

L'importance du système immunitaire dans la lutte contre le cancer est clairement établie. Parmi les acteurs impliqués dans la réponse anti-tumorale, les lymphocytes T occupent un rôle central et notamment les LT CD4 Th1 qui possèdent une activité anti-tumorale propre.
Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés à la relevance immunologique et clinique de la réponse immunitaire CD4 Th1 anti-télomérase chez des patients atteints de cancers.
Nos principaux résultats ont montré que les réponses systémiques CD4 Th1 anti-TERT détectées chez les patients atteints de cancers du poumon diminuent au fur et à mesure des stades de la maladie et sont associées à une amélioration de la survie des patients.
Sur un aspect plus fondamental, différents facteurs peuvent moduler cette réponse Th1 anti-TERT notamment les cellules T épuisées coexprimant PD-1 et TIM-3 ainsi que la présence de facteurs pro-angiogéniques tels que ANGPT2.

Ces résultats soulèvent plusieurs points de discussion qui seront présentés ci-dessous :

- Phénotype, polarisation de la réponse CD4 Th1 anti-TERT périphérique
- Paramètres influençant la réponse CD4 Th1 anti-TERT
- La télomérase comme un antigène de tumeur relevant pour le suivi des réponses T anti-tumorales
- Place de l'ELISpot comme outil de monitoring des lymphocytes T spécifiques
- Relevance clinique de la réponse CD4 Th1 anti-TERT périphérique
- Modulation des réponses CD4 Th1 anti-TERT par les traitements anti-cancéreux
    - Influence des traitements cytotoxiques
    - Utilisation comme biomarqueur des immunothérapies

1. Phénotype, polarisation de la réponse CD4 Th1 anti-TERT périphérique

Dans notre étude, nous avons évalué les réponses CD4 Th1 spécifiques de TERT chez 170 patients par méthode ELISpot en utilisant des peptides dérivés de la télomérase préalablement sélectionnés sur leur capacité à engendrer des réponses T CD4 polarisées Th1 (Godet et al., 2012b; Laheurte et al., 2016).
Néanmoins, l'existence de plusieurs sous-populations de LT CD4 et leur plasticité incitent à évaluer la réactivité des LT CD4 à l'aide de plusieurs cytokines permettant ainsi d'avoir accès à leur polarisation (O'Shea and Paul, 2010). En effet, une équipe a montré que des patients opérés d'un cancer du rein et d'un mélanome et qui présentaient une maladie contrôlée (absence de lésions détectables) avaient des réponses T CD4 circulantes spécifiques de

MAGE-6 à dominante IFN-γ. En revanche, les patients qui avaient une maladie active, présentaient des réponses CD4 anti-MAGE-6 polarisées Th2 avec une production accrue d'IL-5 (Tatsumi et al., 2002). De même, dans le sang périphérique de patients atteints de mélanome avancé, l'équipe de Zelba et al a montré que les réponses T CD4 spécifiques de Melan-A étaient associées à un mauvais pronostique lorsque celles-ci produisaient les cytokines IL-4 et IL-17 (Zelba et al., 2014).

Ainsi dans notre étude, nous avons étudié la nature phénotypique et fonctionnelle des cellules T CD4 spécifiques de TERT par marquage de cytokines intracellulaires (ICS) après stimulation antigénique dans les mêmes conditions que l'ELISpot. Tout d'abord, nous avons montré que les LT CD4 producteurs d'IFN-γ exprimaient à leur surface CXCR3 et pas CCR6. De plus, d'un point de vue fonctionnel, nous avons montré que la stimulation peptidique TERT engendrait préférentiellement la production des trois cytokines Th1: IFN-γ, TNF-α et IL-2 mais pas d'IL-4, ni d'IL-17. Ces arguments phénotypiques et fonctionnels sont en faveur d'une polarisation Th1 et viennent s'ajouter à des données précédentes de notre équipe dont les analyses ELISA ou multiplex des surnageants issus des cellules de patients ou de clones T développés dans la laboratoire cultivés en présence des peptides avaient montré que les peptides stimulaient préférentiellement des LT CD4 sécrétant de l'IFN-γ et du TNF-α et pas d'IL-4 ni d'IL-17 (Godet et al., 2012b; Laheurte et al., 2016). Des expériences *in vivo* avaient également montré qu'une immunisation des souris avec les peptides TERT, engendrait des réponses T CD4 capables de produire de l'IFN-γ détectable *ex vivo*. L'absence de production de cytokines apparentées aux Th2, Treg ou Th17 avait également confirmé leur polarisation Th1 (Dosset et al., 2012).

Néanmoins, l'utilisation de tétramères de classe II spécifiques de TERT nous aurait permis de caractériser directement le phénotype des cellules CD4 spécifiques de la télomérase.

2. Paramètres influençant la réponse CD4 Th1 anti-TERT

Au cours de ce travail, nous avons étudié différents facteurs liés à l'inflammation et l'immunosuppression susceptibles d'influencer la réponse CD4 Th1 anti-TERT.

Tout d'abord, la réponse CD4 anti-TERT étant un paramètre mesuré dans le sang, nous avons regardé l'influence des sous-populations de lymphocytes circulants sur la présence de cette réponse. Parmi les LT, nous avons observé que le taux de CD4 était significativement associé à la positivité de la réponse TERT, les taux de CD4 absolus étant plus importants chez les patients répondeurs à TERT. En revanche, aucune association n'a été retrouvée avec le taux de LT CD8. Cela confirme que la production spécifique d'IFN-γ mesurée par ELISpot contre les peptides HLA de classe II de TERT est principalement limitée au compartiment CD4, comme précédemment démontré (Godet et al., 2012b; Laheurte et al., 2016).

Étant donné que nos résultats mettent en avant une diminution de la fréquence de patients répondeurs à TERT aux stades avancés, il était capital d'éliminer l'influence de la lymphopénie CD4 sur cet aspect. Ainsi, nous avons observé dans notre cohorte que la lymphopénie CD4 influençait de manière similaire la réponse T spécifique quelque soit le stade de la maladie (résultats non montrés).
Par ailleurs, le taux de lymphocytes T CD4 n'influence pas la présence de la réponse anti-virale réfutant une anergie globale des LT CD4 chez ces patients.

Relation entre cellules de l'immunité innée et réponse CD4 anti-TERT

La détection de la réponse anti-TERT par ELISpot suggère une présentation des peptides dérivés de la télomérase par les cellules présentatrices d'antigènes préalable à l'activation des LT CD4. Nous avons donc voulu voir s'il existait un lien entre les cellules dendritiques et la réponse CD4 Th1 anti-TERT. Aucun lien n'a été identifié entre trois sous-populations de DC analysées (DC myéloïdes, plasmacytoïdes et BDCA3+) ainsi que leur état d'activation, avec la réponse anti-TERT. Cela n'est finalement pas surprenant car la réaction de priming a lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

Plusieurs preuves attestent que les cellules NK peuvent façonner le système immunitaire adaptatif en influençant les LT (Pallmer and Oxenius, 2016). Ainsi, dans un autre travail de notre laboratoire mené sur les patients de cette cohorte TeloCap 01 atteints de cancer du poumon, nous avons montré que l'addition d'un anticorps anti-NKp46 lors de la culture *in vitro* des PBMC en présence des peptides dérivés de TERT permettait une amplification ou une restauration de la réponse IFN-γ spécifique (Picard et al., 2019, Annexe 4). Cela suggère que les NK NKp46+ peuvent avoir un effet anti-tumoral inhibiteur de manière contact-dépendant. Compte tenu de l'association positive entre la réponse CD4 Th1 anti-TERT circulante et la survie des patients, cet effet inhibiteur de la réponse anti-tumorale pourrait expliquer le mauvais pronostique que nous avons observé pour des taux élevés de cellules NK $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ exprimant NKp46. Une autre étude dans le microenvironnement tumoral avait rapporté que des TILs CD3-CD56+ NKp46+ exerçaient un effet inhibiteur contre les cellules T effectrices de patients atteints de cancer de l'ovaire (Crome et al., 2017).
De plus, un autre travail du laboratoire sur les ILC (Innate Lymphoid Cell) dans le cancer colorectal suggère une influence des sous-populations d'ILC sur la réponse CD4 anti-TERT, la présence d'un taux élevé d'ILC est inversement corrélée à la réponse CD4 anti-TERT (Loyon et al., 2019).
L'ensemble de ces deux articles suggère un dialogue entre l'immunité adaptative de la réponse CD4 Th1 anti-TERT et l'immunité innée.

T régulateurs CD4+ CD127^{low}CD25^{high} Foxp3+ et réponse anti-TERT Th1 circulante

Les Tregs étant une sous-population de LT CD4 qui reconnaissent également des peptides restreints par le CMH de classe II, nous avons logiquement émis l'hypothèse qu'une stimulation des Tregs par les peptides dérivés de la télomérase serait possible.

En effet, des Tregs spécifiques d'antigènes de tumeurs y compris de la télomérase ont été identifiés dans le sang périphérique des patients atteints de cancer (Vence et al., 2007; Bonertz et al., 2009). Cependant les 8 peptides restreints pan-HLA-DR et HLA-DP4 utilisés dans notre méthode ne sont pas ceux identifiés comme reconnus par les Tregs dans cet article (Bonertz et al., 2009).

Néanmoins, comme l'utilisation du test ELISpot IFN-γ ne permet pas d'éliminer la capacité de ces peptides à stimuler les Tregs *in vitro* notamment chez les patients ne présentant pas de réponses CD4 anti-TERT, nous avons vérifié par test ELISA la production de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 et le TGF-β sécrétés par les Tregs. Ainsi, nous n'avons pas détecté ces deux cytokines dans le surnageant de culture après stimulation par les peptides dérivés de TERT.

Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents de notre équipe qui avaient montré que des clones CD4 anti-TERT isolés chez des patients atteints de cancer avaient une polarisation Th1 produisant majoritairement de l'IFN-γ, du TNF-α et de l'IL-2 et surexprimaient le facteur de transcription Tbet mais pas Foxp3 (Dosset et al., 2012; Godet et al., 2012b; Laheurte et al., 2016). Néanmoins, nous n'avons pas exposé *in vitro* des Tregs purifiés par tri magnétique ou par cytométrie en flux avec les peptides, ce qui permettrait de conclure formellement qu'ils ne sont pas directement reconnus par ces cellules. Cependant, nos travaux précédents chez la souris avaient montré que ces peptides n'induisent pas de Tregs *in vivo* après immunisation (Dosset et al., 2012).

Par ailleurs, des arguments indirects viennent aussi de nos études précédentes dans le cancer du poumon qui n'avaient révélé aucune association entre le taux de Tregs CD4+ Foxp3+ circulants et la réponse CD4 Th1 anti-TERT (Godet et al., 2012b; Laheurte et al., 2019). L'ensemble de ces résultats nous fait donc penser qu'il est peu probable que notre méthodologie puisse engendrer des Tregs spécifiques de la télomérase.

Un taux élevé de MDSC dans le sang est associé à une baisse de la réponse Th1 anti-TERT

Les MDSC sont des cellules myéloïdes suppressives qui constituent un mécanisme clé d'évasion des cellules tumorales (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018).

Un mécanisme crucial par lequel les MDSC exercent leur rôle pro-tumoral est de réguler négativement l'immunité anti-tumorale en particulier les réponses T (Gabrilovich, 2017).

Pour étudier l'influence des MDSC sur la réponse Th1 anti-TERT dans le cancer bronchique, nous avons analysé 5 phénotypes différents de MDSC de type monocytaire (M-MDSC).

Nous avons montré dans le cancer du poumon que les taux circulants des M-MDSC étaient significativement plus faibles chez les patients ayant des réponses CD4 Th1 anti-TERT comparé au groupe non répondeur à TERT (Figure 31A).

Cette corrélation inverse avec la réponse anti-TERT a été confirmée dans d'autres cancers au sein de notre équipe tels que le mélanome, tumeurs digestives, et dans le glioblastome (Nardin et al, Spehner et al, Meynard et al, articles en préparation) (Figure 31B, C). Par ailleurs, nos résultats non publiés ont révélé une restauration de la réponse Th1 anti-TERT chez les patients après stimulation peptidique *in vitro* de PBMC préalablement déplétés en MDSC. L'équipe de Weide et al avait précédemment rapporté des résultats similaires avec des réponses T périphériques anti-NY-ESO-1 dans le mélanome (Weide et al., 2014).

Il existe donc une relation inverse entre le taux de M-MDSC et la réponse immunitaire anti-tumorale. Sur le plan clinique, nous avons observé qu'un taux sanguin élevé de deux phénotypes de M-MDSC circulants parmi les 5 populations étudiées *(HLA-DR^{lo} CD14^{+} et HLA-DR^{lo}CD14^{+}CD33^{hi}CD11b^{+})* était associé à un mauvais pronostique, indépendamment du stade du cancer bronchique. Ces résultats montrent aussi que le phénotype minimal *HLA-DR^{lo} CD14^{+}* s'avère suffisant pour le monitoring des M-MDSC circulants chez les patients atteints de cancer (Bronte et al., 2016; Veglia et al., 2018).

Ces résultats confortent de nombreuses données de la littérature démontrant un effet délétère de l'accumulation de MDSC circulants dans les cancers humains (Diaz-Montero et al., 2014; Vetsika et al., 2014; Angell et al., 2016; Zhang et al., 2016; Yang et al., 2017).

Compte tenu de l'association positive de la réponse Th1 anti-TERT circulante et la survie des patients, nous émettons l'hypothèse que l'effet délétère des MDSC pourrait être lié à la capacité des M-MDSC à inhiber cette réponse. Cependant dans ce travail, nous n'avons pas exploré les mécanismes via lesquels les MDSC inhibent la réponse CD4 anti-TERT. Ces aspects nécessitent des investigations futures.

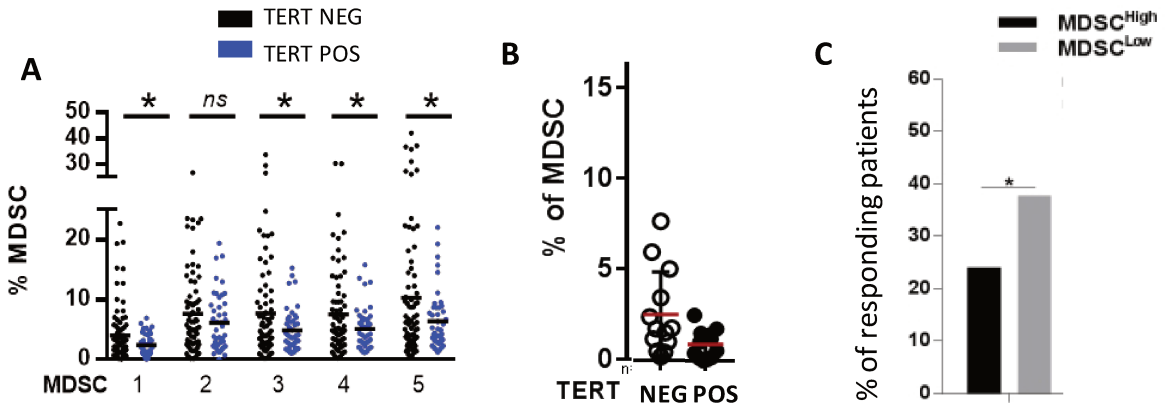


Figure 31 : Association entre le taux de M-MDSC et la réponse CD4 Th1 anti-TERT dans différents cancers. A, Taux des 5 sous-types de M-MDSC en fonction de la présence ou absence de réponse CD4 Th1 anti-TERT chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules, B, Pourcentage de M-MDSC chez des patients atteints de mélanome ayant des réponses CD4 anti-TERT négatives ou positives. C, Fréquence de patients TERT répondeurs en fonction du taux de M-MDSC chez des patients atteints de cancer du canal anal.

La réponse CD4 Th1 anti-TERT limite l'accumulation de lymphocytes T PD-1+ TIM-3+ dans le sang périphérique

Dans cette cohorte de patients de cancer bronchique, nous avons observé un taux élevé de lymphocytes T circulants de phénotype épuisé exprimant PD-1 et/ou TIM-3 chez les patients comparés aux individus sains. L'épuisement lymphocytaire est défini comme un état « d'anergie » des lymphocytes se caractérisant par l'altération ou la diminution des fonctions effectrices, tels que la diminution de la sécrétion des cytokines, la réduction des capacités prolifératives, menant les cellules à un état non fonctionnel (Blank et al., 2019).

Nous avons confirmé ces observations puisque les LT circulants exprimant PD1+/TIM3+ détectés chez les patients expriment très faiblement Ki-67 contrairement aux LT PD1-/TIM3- . Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature suggérant une accumulation de LT de phénotype épuisé chez les patients atteints de cancer et pourrait être le reflet d'une stimulation tumorale chronique comme dans le cas d'une infection virale (Shimauchi et al., 2007; Malaspina et al., 2011; Pauken and Wherry, 2015).

Contrairement aux LT CD8, les taux circulants de LT CD4 PD-1+/TIM-3+ sont significativement plus élevés aux stades métastatiques qu'aux stades précoces du cancer. Une explication plausible est que chez les patients atteints de cancer, les LT CD8 épuisés seraient majoritairement présents dans le microenvironnement tumoral que dans le sang périphérique contrairement aux LT CD4 (Thommen et al., 2015; Giraldo et al., 2017; Granier et al., 2017). La corrélation de ces données dans le sang périphérique avec celles issues d'analyses de l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral permettrait d'étayer ou non notre hypothèse.

Un résultat majeur de ce travail de thèse est la mise en évidence d'une relation opposée entre les réponses Th1 anti-TERT et les lymphocytes T notamment CD4 exprimant PD-1+/TIM-3+. En effet, le taux de LT CD4 exprimant ces checkpoints était deux fois plus faible chez les patients ayant une réponse Th1 anti-TERT positive par comparaison aux patients non répondeurs. Cette association était significativement plus marquée avec les lymphocytes T CD4 et CD8 exprimant TIM-3. En effet, l'expression de TIM-3 est associée à un état d'épuisement avancé. Par exemple, une étude menée dans le cancer du rein, sur les TILs a clairement mis en évidence le poids néfaste de TIM-3 dans la co-expression PD-1/TIM-3 sur la fonction des TILs (Granier et al., 2017). Nos résultats suggèrent qu'une forte réponse Th1 anti-TERT circulante exercerait une pression négative sur les LT exprimant TIM-3.

De récentes données de la littérature démontrent que les T CD4 helper préviennent contre l'épuisement lymphocytaire T en particulier CD8 en induisant une répression de l'expression des récepteurs inhibiteurs tels que PD-1, TIM-3 et LAG-3 en favorisant des LT CD8 avec une meilleure qualité effectrice (Ahrends et al., 2017; Zander et al., 2019). Un des mécanismes de help des CD4 dans ce processus de différenciation des LT CD8 implique la cytokine IL-21 produite par les LT CD4 (Zander et al., 2019). De plus, ces études ont démontré que les immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 étaient moins efficaces en l'absence de help fourni par les T CD4.

Les récepteurs inhibiteurs impliqués dans l'épuisement lymphocytaire tels que PD-1, TIM-3, sont préférentiellement exprimés sur les lymphocytes qui ont préalablement rencontré l'antigène (Fourcade et al., 2010; Wherry, 2011). Ainsi, le fait que les taux des lymphocytes T PD-1+/TIM-3+ soient plus élevés chez les patients sans réponse CD4 anti-TERT, et que les patients non répondeurs appartiennent majoritairement au stade avancé du cancer soulèvent la question d'un rôle potentiel de l'épuisement immunitaire. Nous avons émis l'hypothèse que la détection des LT CD4 anti-TERT serait impactée par l'expression des récepteurs inhibiteurs. Cependant, le test d'ELISpot utilisé dans notre étude pour mesurer la réponse CD4 anti-TERT périphérique ne permet pas de répondre à la question d'une manière satisfaisante. La disponibilité de multimères pMHC classe II ainsi que l'optimisation récente de cette technologie (Rockinger, Jandus et al en révision dans JITC) nous permettraient dans le futur d'aborder ces questions fondamentales. En effet, d'autres marqueurs d'épuisements non explorés dans cette étude ont été décrits tels que CTLA-4, TIGIT, LAG3, TCF1 (Anderson et al., 2016; Buchholz and Busch, 2019). Cependant la co-expression de TIM-3 traduit souvent l'expression des autres checkpoints (Thommen et al., 2015).

Néanmoins, certains arguments expérimentaux nous orientent vers l'expression des récepteurs PD-1 ou TIM-3 sur les T CD4 spécifiques de TERT. En effet, nous avons montré

qu'il était possible de restaurer la réponse immune anti-TERT chez certains patients en présence d'anticorps monoclonaux anti-PD-1(L1) et anti-TIM3.
Ces résultats indiquent que des lymphocytes T CD4 anti-TERT fonctionnellement épuisés sont présents dans le sang périphérique des patients. En utilisant une approche similaire couplée au marquage de cytokines intracellulaires et tétramères, des études antérieures avaient rapporté la présence de lymphocytes T CD8 circulants spécifiques d'antigènes tumoraux de phénotype épuisé dans différents cancers (Fourcade et al., 2010; Chauvin et al., 2015).

On sait maintenant qu'il existe plusieurs degrés d'épuisements fonctionnels des cellules T effectrices, passant d'abord par un stade de lymphocytes T épuisés précurseurs à un stade d'épuisement terminal. Tandis qu'un blocage des récepteurs inhibiteurs au stade précurseur permet de revenir à un état fonctionnel, au contraire les LT en état de différentiation terminale ne le peuvent pas (Chen and Mellman, 2017; Buchholz and Busch, 2019). Par conséquent, la restauration possible de la production d'IFN-γ et TNF-α par les lymphocytes T CD4 anti-TERT périphériques après blocage des checkpoints, suggère que certains de ces lymphocytes T CD4 spécifiques ne seraient pas à un stade d'épuisement terminal. Ces résultats sont particulièrement intéressants pour les perspectives d'immunothérapies et pour évaluer l'activité et l'efficacité des inhibiteurs de checkpoints. Nous reviendrons sur cet aspect dans la dernière partie de la discussion.
Par ailleurs, l'existence de lymphocytes T CD4 anti-TERT non détectables même après une semaine de stimulation peptidique *in vitro* confirme le statut épuisé de ces cellules T mais souligne l'intérêt d'utiliser un test fonctionnel tel que l'ELISpot capable de mesurer des lymphocytes spécifiques et fonctionnels chez les patients atteints de cancer. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que la présence de la réponse CD4 anti-TERT entraine une diminution de l'épuisement lymphocytaire.

Influence des cytokines sériques sur la réponse anti-TERT

Les T CD4 helper sont caractérisés par leur plasticité, qui dépend fortement de l'environnement cytokinique dans lequel le LT CD4 se trouve (O'Shea and Paul, 2010). Bien que les CD4 Th1 et Th2 soient les plus stables, ils peuvent tout de même transiter vers un autre phénotype lorsqu'ils sont soumis à une cytokine opposée, par exemple, en présence d'IFN-γ, les lymphocytes Th2 mémoires ont montré leur capacité à co-exprimer GATA-3 et T-Bet et à produire à la fois de l'IL-4 et de l'IFN-γ (Hegazy et al., 2010).
Ainsi nous avons cherché à voir si le taux sérique des cytokines inflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-17), Th2 (IL-5, IL-13) et inhibitrices (IL-10, TGF-β) pouvait être associé à la réponse CD4 Th1 anti-TERT.

Les taux des cytokines inflammatoires IL-1β, IL-6, IL-17 mesurées au même moment ne semblent pas influencer la présence, ni l'amplitude de la réponse Th1 anti-TERT chez les patients (Figure 32). Des observations similaires ont été faites concernant le taux circulant d'IL-5 et IL-13.

Aucune association significative n'a été retrouvée avec la concentration sérique d'IL-10 et de TGF-β avec la réponse CD4 Th1 anti-TERT. Cependant, les taux sériques d'IL-10 et TGF-β ont été retrouvés plus élevés chez les patients métastatiques comparés à ceux ayant un cancer localisé (stade I à III) comme déjà rapporté dans la littérature (Suzuki et al., 2011) (Figure 32).

Ces données pourraient être un des facteurs pouvant expliquer le faible taux de la réponse anti-TERT Th1 détectée chez les patients métastatiques.

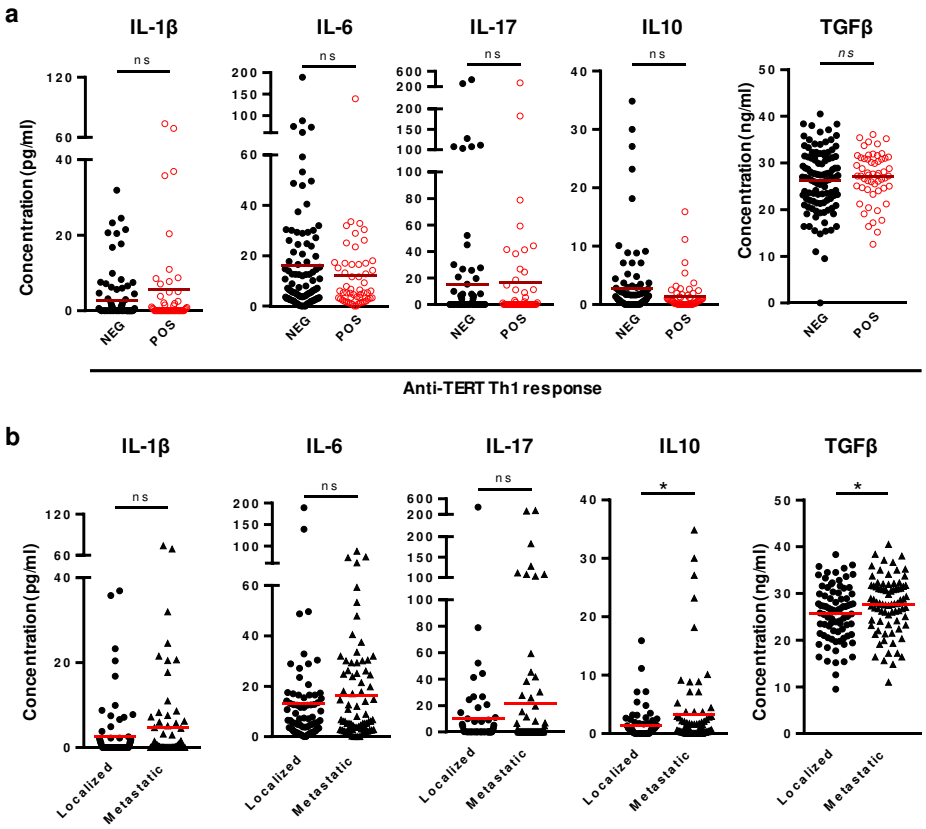


Figure 32 : Taux de cytokines inflammatoires et inhibitrices mesurées dans le sérum des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. a, Concentration sérique en fonction de la présence ou de l'absence de réponse CD4 Th1 circulante anti-TERT. b, Concentration sérique en fonction du stade localisé (I à III) ou métastatique (IV) des patients.

Rôle des facteurs pro-angiogéniques VEGF et Angiopoiétine 2 (ANGPT2)

Longtemps étudié pour ses propriétés anti-angiogéniques, le VEGF-A possède également des propriétés immunomodulatrices favorisant l'échappement des cellules tumorales à la

surveillance du système immunitaire. Par exemple, le VEGF-A induit la prolifération des Tregs (Terme et al., 2013). De plus, il a été décrit que la voie du VEGF-A/VEGF-R est impliquée dans l'épuisement des TILs CD8+ et peut modulée l'expression de PD-1 à la surface de ces TILs (Voron et al., 2015). L'ANGPT2 est moins étudiée que le VEGF sur ces aspects immunomodulateurs mais il a été montré qu'elle avait les capacités de promouvoir le recrutement des cellules immunosuppressives comme les MDSC et les Tregs (Coffelt et al., 2011; Scholz et al., 2011).

Nos résultats ont montré une corrélation inverse entre les taux sériques de VEGF-A et ANGPT2 et la réponse Th1 anti-TERT chez les patients atteins de cancer bronchique. Ainsi les patients répondeurs à TERT avaient des taux sériques significativement plus faibles que les non répondeurs (Joseph et al., 2019) (Figure 33A). Cette tendance était également observée avec les réponses Th1 dirigées contre deux autres antigènes partagés tels que NY-ESO-1 et WT-1 (Figure 33). En revanche aucun lien n'était noté entre les taux circulants de VEGF-A ou ANGPT2 et les réponses T antivirales mesurées dans les mêmes conditions par ELISpot IFN-γ. Concernant particulièrement ANGPT2, nous avons observé que son taux influence la qualité et l'intensité des réponses périphériques Th1 spécifiques de TAA. En effet, plus le taux d'ANGPT2 sérique est élevé, moins les patients présentent de réponses Th1 poly-spécifiques. Par exemple, 21% des patients avec un faible taux sérique d'ANGPT2 ont des réponses Th1 contre au moins 2 antigènes contre seulement 4% pour la population avec un taux élevé d'ANGPT2. De plus, le nombre moyen de lymphocytes Th1 anti-TERT circulants est 2 fois plus élevé chez les patients possédant un taux sérique faible comparé à ceux ayant un profil ANGPT2^{hi}. Cette influence n'est pas observée avec le taux sérique de VEGF-A (Figure 33).

Ces résultats suggèrent que la concentration de ces facteurs pro-angiogéniques en particulier ANGPT2 pourrait influencer la réponse périphérique Th1 anti-TERT chez les patients.

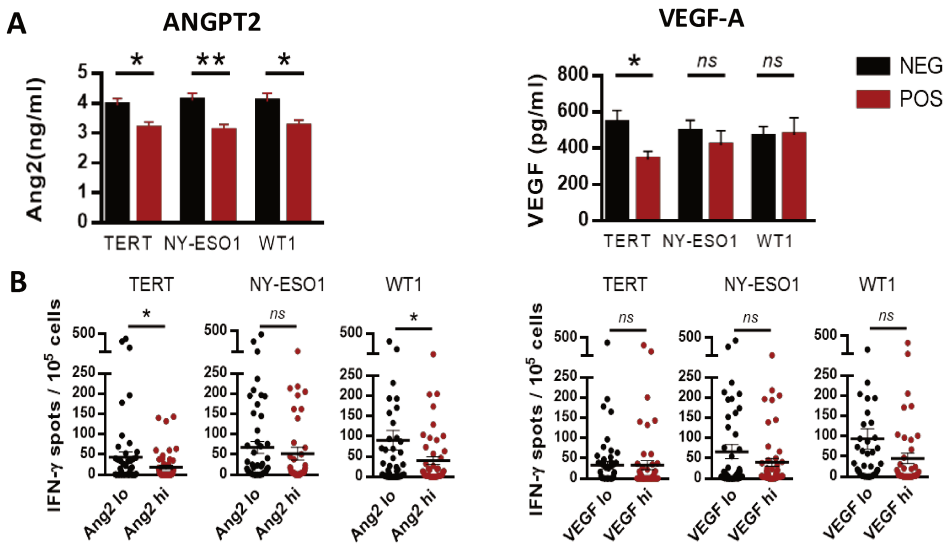


Figure 33 : Association entre la réponse T anti-tumorale et le taux sérique de cytokines pro-angiogéniques ANGPT2 et VEGFA mesurées chez des patients atteints de cancer du poumon. A, Concentration de ANGPT2 et de VEGF-A en fonction de la présence ou de l'absence de réponse CD4 Th1 circulante anti-TERT, anti-NY-ESO-1 et anti-WT-1. B, Intensité de la réponse T anti-tumorale spécifique de TERT, NY-ESO-1 et WT1 en fonction du taux bas ou élevé de ANGPT2 ou VEGF-A.

Ainsi nous avons étudié de manière plus approfondie l'implication de l'ANGPT2 dans la régulation de la réponse périphérique anti-TERT Th1 (article 2, Joseph et al., 2019).

L'ANGPT2 est impliquée dans l'angiogénèse complexe, aux stades avancés de l'oncogénèse, elle intervient dans le remodelage vasculaire, en agissant sur les cellules endothéliales qui vont alors sécréter des protéases qui vont dégrader la membrane basale et la matrice extracellulaire (MEC) permettant ainsi la migration des cellules endothéliales et libérant d'autres facteurs pro-angiogéniques contenus dans la MEC.

Dans un premier temps, nous avons montré que le taux d'ANGPT2 circulant était plus élevé chez les patients atteints de cancer bronchique que les individus sains. Un taux d'ANGPT2 élevé était observé aux stades métastatiques comparé aux stades localisés. De plus, nos résultats ont montré qu'un taux élevé d'ANGPT2 était associé à une survie très défavorable aussi bien au stade métastatique qu'à un stade précoce du cancer bronchique. Ces données sont concordantes avec celles de la littérature et suggèrent un lien fort entre la néo-angiogenèse complexe médiée par ANGPT2 et la progression du cancer (Helfrich et al., 2009; Jary et al., 2015; Xu et al., 2017).

Ce rôle délétère d'ANGPT2 sur l'évolution du cancer pourrait également être dû à l'inhibition de l'immunité anti-tumorale comme laisse supposer nos résultats.

Par la suite, nous avons testé l'effet de l'ajout d'ANGPT2 recombinante pendant la stimulation *in vitro* des lymphocytes en présence des peptides dérivés de TERT. A l'aide de patients sélectionnés sur la base de leur réponse positive Th1 anti-TERT, nous avons montré que l'ajout d'ANGPT2 recombinante entraine une diminution ou la perte de la réponse Th1 anti-

TERT chez la majorité des patients et cela dans plusieurs cancers différents. Un effet similaire était observé contre les réponses Th1 spécifiques de NY-ESO-1. Ces résultats suggèrent fortement un effet immunosuppresseur direct d'ANGPT2 sur les réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs.

Pour élucider le mécanisme impliqué dans l'effet inhibiteur de ANGPT2 sur les réponses T anti-tumorales circulantes, nous nous sommes intéressés à son récepteur à tyrosine kinase TIE-2. Une fois sécrété, l'ANGPT2 peut se fixer sur son récepteur principal, TIE2 qui est surtout exprimé à la surface des cellules endothéliales, mais également sur certains types de monocytes, les TEM (TIE-2 expressing monocytes/macrophages). A forte concentration, l'ANGPT2 active TIE2 par la voie PI3K et entraine la phosphorylation d'AKT, menant à la survie des cellules endothéliales (De Palma et al., 2005; Huang et al., 2010)

Comme les lymphocytes T n'expriment pas le récepteur TIE2, nous avons émis l'hypothèse que l'action inhibitrice d'ANGPT2 passerait indirectement par des cellules monocytaires qui elles sur-expriment ce récepteur.

Par conséquent, nous avons pensé à l'implication des MDSC monocytaires (M-MDSC) compte tenu de l'influence négative de ces cellules sur la réponse Th1 anti-TERT circulante abordée précédemment. Cependant, contrairement aux TEM, aucune étude n'avait décrit des sous-populations de M-MDSC exprimant TIE2.

Ainsi, nos travaux ont tout d'abord permis de décrire une nouvelle sous-population de M-MDSC surexprimant le récepteur d'ANGPT2 et qui est préférentiellement détectable chez les patients atteints de cancer bronchique par rapport aux individus sains. Nous avons mis en évidence une corrélation positive entre les sous-types de M-MDSC TIE2+ et le taux sérique d'ANGPT2 chez les patients. Comme attendu, on retrouve dans la circulation des patients de stades métastatiques une forte accumulation de la signature M-MDSC-TIE2/ANGPT2 comparé aux stades précoces.

Afin de démontrer l'implication de M-MDSC-TIE2+ dans l'activité suppressive de ANGPT2, nous avons utilisé différentes approches de déplétion de ces cellules à partir de PBMC de patients ayant un taux circulant élevé de M-MDSC-TIE2+. Pour éliminer les MDSC-TIE2+ de la culture, nous avons utilisé un agoniste du LXR (GW 3965) déjà décrit pour dépléter les MDSC mais non spécifique de la population TIE2, ainsi qu'une déplétion magnétique par CD11b car nous avons montré que cette sous-population de MDSC était $CD11b^{high}$. Nous avons ainsi montré une diminution ou perte de l'effet inhibiteur d'ANGPT2 sur la réponse Th1 anti-TERT en absence des MDSC-TIE2 durant la stimulation *in vitro*, suggérant que l'action d'ANGPT2 passe par les M-MDSC-TIE2+.

Cependant, dans cette expérience nous ne pouvons pas formellement éliminer une participation des TEMs qui expriment le marqueur CD11b. En effet, les TEMs décrites en 2005

par l'équipe de De Palma correspondent à une population de cellules monocytaires exprimant le récepteur TIE2. Chez la souris, ces cellules, CD45+ CD11b+ GR-1low/- étaient capables de quitter le compartiment sanguin, d'infiltrer la tumeur, de stimuler l'angiogenèse et le développement tumoral (De Palma et al., 2005). Chez l'Homme, ces cellules HLADR+CD14+ CD11b+ CD16+ à la fois présentes dans le sang et les pièces tumorales ont montré un pouvoir proangiogénique et protumoral dans des modèles de xénogreffe (Venneri et al., 2007). Les travaux de l'équipe de Murdoch ont montré qu'en condition d'hypoxie, l'ANGPT2 était capable d'induire le recrutement de ces monocytes exprimant TIE2 au lit tumoral et de promouvoir leurs fonctions pro-angiogéniques (Murdoch et al., 2007). Par la suite, l'équipe de Coffelt a montré au sein de ces monocytes que l'axe ANGPT2/TIE2 induisait le recrutement et la prolifération de Tregs via un mécanisme IL-10 et CCL17 dépendant. Ces Tregs étaient par la suite capable d'inhiber la prolifération de LT CD4 et CD8 stimulés par les billes CD3/CD28 (Coffelt et al., 2011). Enfin, l'équipe de De Palma a soulevé la question de l'appartenance de ces monocytes exprimant TIE2 au pool des MDSC du fait de leur origine commune et de leur activité immunosuppressive (Coffelt et al., 2011). D'un point de vue phénotypique, elles peuvent être distinguées des M-MDSC sur la base de l'expression de HLA-DR (Gabrilovich, 2017).

Pour confirmer l'implication de l'axe M-MDSC-TIE2/ANGPT2 dans l'inhibition de la réponse CD4 anti-TERT, nous avons utilisé des expériences de co-culture de MDSC-TIE2^{high} préalablement triées, avec un clone CD4 Th1 anti-TERT décrit par notre équipe (Godet et al., 2012b; Galaine et al., 2016). Ces expériences ont permis de démontrer que l'ANGPT2 sensibilise les MDSC-TIE2 en augmentant leur capacité suppressive contre le clone anti-TERT Th1. Ainsi nous avons montré que des MDSC-TIE2^{high} pré-incubées en présence d'ANGPT2 inhibaient plus efficacement la production d'IFN-γ ou de TNF-α par le clone anti-TERT par comparaison aux MDSC-TIE2+ non exposées à ANGPT2. De plus, cet effet sensibilisant d'ANGPT2 était perdu lorsque nous avons utilisé des MDSC-TIE2^{low} démontrant que son action inhibitrice est médiée par son récepteur exprimé par les M-MDSC du sang périphérique. Contrairement aux études sur l'effet immuno-modulateur du VEGF, peu de données de la littérature décrivent un rôle de l'ANGPT2 sur l'immunité anti-tumorale (Coffelt et al., 2011; Scholz et al., 2011; Holopainen et al., 2012). Les résultats de ces travaux ont donc permis de décrire un nouveau mécanisme d'échappement tumoral qui implique l'axe ANGPT2/MDSC-TIE2+ (Figure 34).

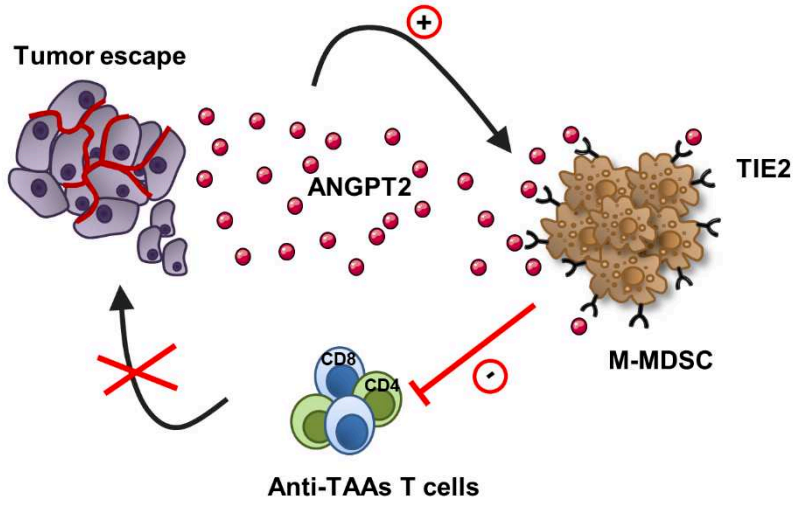


Figure 34 : Modèle de suppression des réponses T anti-tumorales médié par l'axe ANGPT2 / M-MDSC TIE2+.

Cependant ce travail ouvre plusieurs perspectives qui sont en cours d'évaluation dans le laboratoire. Sur le plan fondamental, il est prévu d'explorer les mécanismes suppresseurs précis utilisés par les MDSC-TIE2. Ainsi il serait intéressant de savoir si cette sous-population de MDSC utilise préférentiellement des mécanismes d'inhibition contact cellulaire ou non. Sur le plan clinique, nous avons montré qu'il était possible de stratifier le pronostic des patients en fonction de l'intensité de la signature ANGPT2/MDSC-TIE2+ dans le sang périphérique. Sous réserve de confirmer la relevance clinique de ces données dans d'autres cancers, il serait intéressant d'évaluer l'intérêt de cette signature immuno-angiogénique comme biomarqueur potentiel de résistance aux immunothérapies.

3. La télomérase comme un antigène de tumeur relevant pour le suivi des réponses T anti-tumorales

La télomérase est la cible antigénique étudiée durant ce travail de thèse. Nos résultats démontrent qu'il pourrait être un antigène de tumeur potentiellement intéressant pour le suivi des réponses immunitaires Th1 anti-tumorales chez les patients atteints de cancer.
Actuellement, il n'existe pas de consensus concernant le choix de l'antigène tumoral pour l'immunomonitoring. Théoriquement tous les antigènes tumoraux peuvent être utilisés. Néanmoins certaines caractéristiques sont essentielles pour le choix de l'antigène tumoral appliqué à la mesure des réponses T anti-tumorales dans le sang de patients atteints de cancers.

En s'inspirant des critères de classification des antigènes proposés par le consortium du National Cancer Institute (Cheever et al., 2009) qui avait été proposé en 2009 dans le but d'apporter un outil au développement de stratégies thérapeutiques vaccinales, nous proposons 5 critères qui pourraient être utilisé pour le monitoring des réponses T spécifiques (Figure 35).

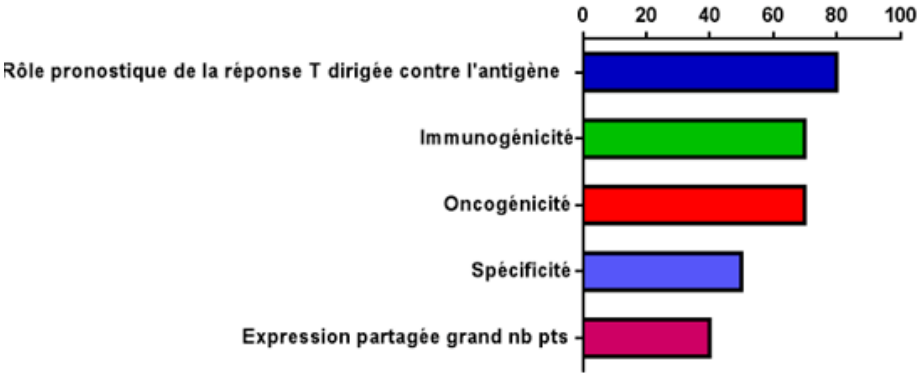


Figure 35: Classification proposée pour un monitoring de l'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs

Critère n°1 : Rôle pronostique de la réponse T dirigée contre l'antigène

Afin de suivre le statut immunitaire d'un patient, nous pensons qu'il est important de pouvoir suivre un paramètre qui renseigne sur l'évolution de la maladie, ou sur le pronostique des patients.

Cependant cet aspect reste encore très peu étudié, sur 74 études répertoriées en Annexe 1, seules 22 ont abordé la relation avec les paramètres cliniques des patients (table 8). Dans notre étude, nous avons montré que les réponses T anti-TERT étaient pronostiques dans le cancer du poumon et plusieurs données de notre équipe montrent que les réponses T spécifiques de cet antigène sont associées à un bon pronostique également dans d'autres cancers, tels que mélanome, cancer du côlon métastatique, cancers du rein, et cancer du canal anal (Table 10).

Par ailleurs, nous avons montré la corrélation entre la présence de la réponse naturelle Th1 anti-TERT avec le stade du cancer du poumon. Plus le cancer avance, plus nous avons noté une perte de cette réponse immunitaire contre cet antigène. Cette diminution de la réponse T CD4 anti-TERT ne peut être liée à une perte de l'expression tumorale de l'antigène au stade avancé ou métastatique car c'est l'inverse qui a été décrit. En effet, la télomérase est fortement surexprimée dans les tumeurs avancées du cancer bronchique par comparaison aux tumeurs localisées (Marchetti et al., 2002; Wu et al., 2003; Zhu et al., 2006; Lantuéjoul et al., 2007) . Bien que nous n'ayons pas analysé l'expression tumorale de TERT dans notre cohorte, des résultats du laboratoire ont montré cette même tendance à la baisse de fréquence de la

réponse anti-TERT aux stades avancés dans d'autres types de cancers tels que le mélanome, cancer colorectal et cancer du sein.

Ces résultats suggèrent donc que la télomérase peut être un bon outil en tant que surrogate marqueur de l'immunité anti-tumorale.

Critère n°2 : Immunogénicité

Bien entendu, ce critère est essentiel dans le cadre d'un suivi des LT spécifiques d'antigènes de tumeur. De nombreux antigènes de tumeur peuvent être reconnus par les LT (Vigneron, 2015), néanmoins, ceux qui répondent le mieux à ce critère sont les antigènes viraux et mutés. Absents des cellules normales, le répertoire des LT vis-à-vis de ces antigènes spécifiques des cellules tumorales n'est pas restreint par la tolérance au soi. Cette spécificité tumorale, conduit à la présence des lymphocytes T pouvant exprimer un TCR très affin pour les néoépitopes et les antigènes viraux.

Néanmoins, plusieurs études ajoutées à la nôtre et à des données de notre équipe montrent que la télomérase est un antigène immunogène (Beatty and Vonderheide, 2008; Harley, 2008; Zanetti, 2017). Au sein de notre laboratoire, les réponses CD4 anti-TERT ont été détectées dans 8 types de cancers différents, avec des fréquences de réponses variant entre 24 et 60% avec une moyenne située à 38% (Table 10, paragraphe 5 de la discussion).

Critère n° 3 : Rôle critique dans le processus oncogène

Plus l'antigène de tumeur aura un rôle essentiel pour la cellule tumorale, moins il subira la pression de sélection et le risque d'être perdu.

En plus de son rôle sur le maintien et l'allongement des télomères, conférant un avantage indispensable à la survie des cellules tumorales, la télomérase a un rôle critique dans l'oncogénèse. Elle est notamment impliquée dans la prolifération, la résistance à l'apoptose, l'angiogénèse et la promotion des cellules souches cancéreuses (Low and Tergaonkar, 2013; Shay, 2016). Pour cela, elle est soumise à plusieurs mécanismes de régulation.

Dans les cancers bronchiques la régulation de l'expression de TERT est assez complexe. Par exemple, les mutations activatrices du promoteur de TERT les plus fréquentes 124C>T et 148C>T ne sont pas retrouvées pas dans le cancer du poumon (Vinagre et al., 2013) et nous l'avions confirmé au sein de cette cohorte (résultats non montrés). Ces mutations décrites dans plusieurs cancers dont le chef de file est le glioblastome (environ 80 % des cas) sont associées à une augmentation de l'expression de TERT dans les cellules cancéreuses (Vinagre et al., 2013; Stern et al., 2015; Min and Shay, 2016). Certaines mutations de TERT sont également associées à une agressivité de la maladie et donc de mauvais pronostic comme par exemple dans le glioblastome, le cancer de la vessie et le mélanome (Horn et al., 2013; Borah et al., 2015). Par exemple, dans le mélanome cette mutation activatrice du

promoteur de TERT est un évènement très précoce dans le processus oncogénique (Shain et al., 2015).

La réactivation de la télomérase via des processus de réarrangements géniques ont été décrits dans certaines tumeurs comme le neuroblastome qui leur confèrent aussi une agressivité tumorale (Peifer et al., 2015; Valentijn et al., 2015).

De plus, plusieurs polymorphismes du promoteur du gène de TERT ont été décrits dans les cancers bronchiques conduisant à une expression de variants de TERT qui assurent le maintien des télomères (Catarino et al., 2010). Des études ont montré que certains polymorphismes du locus étaient associés un risque accru de développer un cancer (Mocellin et al., 2012).

Quoiqu'il en soit, les altérations géniques qui touchent le gène TERT confèrent inexorablement un avantage de survie aux cellules tumorales en assurant l'intégrité de leur télomère indéfiniment. Ce déterminisme génétique de la surexpression de TERT dans les cancers renforce son rôle critique dans le processus de cancérisation.

Critère n°4 : Spécificité tumorale

La présence de réponses lymphocytaires T contre les antigènes tumoraux chez les donneurs sains est souvent rapporté pour la majorité des antigènes de différentes familles, par exemple, contre p53, Cycline D1, Melan-A, NY-ESO-1, CEA (Tsuji et al., 2009; Chevaleyre et al., 2015; Dutoit et al., 2002; Costa-Nunes et al., 2019). Récemment, il a été confirmé que les donneurs sains présentaient une fréquence importante de précurseurs de T CD4 et CD8 spécifiques de la télomérase et dont l'explication serait en faveur d'une absence de l'expression de TERT par les cellules épithéliales médullaires thymiques (Vonderheide et al., 2001; Costa-Nunes et al., 2019). Cette présence de LT spécifiques de TERT chez les donneurs sains peut être un signe d'ignorance immunitaire compte tenu du rôle essentiel du complexe « telomérique » pendant la vie fœtale et/ou un stigmate d'une immunosurveillance (Cherfils-Vicini et al., 2014).

Seuls les antigènes dérivés de protéines du non-soi comme les antigènes viraux ou néoantigènes présentent une spécificité tumorale unique. Néanmoins, au-delà de la complexité liée à l'identification des néoantigènes, ces derniers résultant de mutations aléatoires sont spécifiques au patient lui-même et peuvent être exprimées de manière hétérogène dans les tumeurs. Les mutations oncogéniques sont en revanche d'avantage partagées et elles peuvent être à l'origine de néoantigènes exprimés dans plusieurs tumeurs. Par exemple, les néoantigènes créés par la mutation KRASG12V reconnue par les lymphocytes T CD4 des patients se retrouve dans 4% des cancers du poumon, 10% des cancers colorectaux, 30% des cancers du pancréas et 8% des cancers ovariens (Veatch et al., 2019).

Critère n°5 : Expression partagée par de nombreux cancers

Mis à part les antigènes viraux qui sont exprimés uniquement dans les tumeurs viro-induites (cancer du col de l'utérus, hépatocarcinome, lymphome de Burkitt), plusieurs antigènes de tumeurs présentent l'avantage d'être surexprimés dans de nombreux cancers, ce qui est particulièrement le cas pour la télomérase qui est surexprimée de manière constitutive dans presque toutes les tumeurs humaines (85 à 90%) (Shay, 2016). De plus, la télomérase est également exprimée dans les cancers viro-induits puisque plusieurs virus ont besoin d'exprimer la télomérase pour devenir tumorigène. Par exemple, dans le cas du virus à HPV, l'oncoprotéine E6 possède la capacité d'activer la transcription du gène TERT en se liant à c-myc (Liu et al., 2009).

En résumé, la télomérase est une enzyme surexprimée dans la majorité des cancers humains, ses fonctions canoniques et oncogéniques sont indispensables à la survie de la cellule tumorale, lui conférant à la fois une forme d'immortalité et une stabilité. Ainsi, contrairement aux marqueurs du microenvironnement tumoral, elle subit très peu l'hétérogénéité.
Tous ces arguments soutiennent l'utilisation de la télomèrase comme un antigène de tumeur intéressant pour une application d'immunomonitoring des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeur.

4. Place de l'ELISpot comme outil de monitoring des lymphocytes T spécifiques

Les réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs sont généralement analysées par trois principales techniques qui sont l'ELISpot, les multimères de peptide pMHC, et le marquage de cytokines intracellulaires (ICS). Dans notre étude, le test ELISpot IFN-γ a été choisi pour mesurer les LT CD4 en réponse à une stimulation peptidique TERT.

Nous avons choisi ce test pour réaliser l'analyse à grande échelle des réponses T CD4 spécifiques d'antigènes de tumeurs dans une cohorte de 170 patients car c'est une méthode fonctionnelle, quantitative, sensible, et standardisée (Neubauer et al., 2017).
L'ELISpot est utilisé dans de nombreux domaines de l'immunologie, allant de la recherche fondamentale et translationnelle au diagnostic (Meier et al., 2005; Streeck et al., 2009; Saletti et al., 2013). Par exemple, dans les essais de vaccination thérapeutique anti-tumorale, le test ELISpot représente le « golden standard » de l'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs (Neubauer et al., 2017). La corrélation entre les bénéfices cliniques et

les réponses immunologiques évaluées par ELISpot a été démontrée dans de récents essais d'immunothérapies anti-cancer (Kenter et al., 2009; Walter et al., 2012; Sheikh et al., 2013).
A l'heure actuelle, l'ELISpot est le seul test bénéficiant d'une réelle automatisation ; sa disponibilité sous forme de kit permet de diminuer les variabilités intra et inter laboratoire, avantage intéressant lors de l'analyse des réponses T spécifiques à large échelle. Néanmoins, l'ELISpot est généralement un test mono-paramétrique car l'analyse simultanée de 2 à 3 cytokines est techniquement plus délicate à mettre en place. Bien que l'IFN-γ représente la cytokine Th1 par excellence, il est possible que les cellules T spécifiques ne produisent pas que cette cytokine et au contraire produisent d'autres cytokines Th1 (TNF-α et IL-2) mais également Th2 ou Th17.
Dans notre cas nous avions montré qu'il existait une forte corrélation entre la production d'IFN-γ et de TNF-α par les LT CD4 anti-TERT (Figure 36, Annexe 3). La production des autres cytokines de type Th2 ou Th17 n'a pas été détectée ni chez les patients producteurs d'IFN-γ, ni chez les patients négatifs (Godet et al., 2012b; Laheurte et al., 2016).
Dans le cadre d'une analyse plus complète de la fonctionnalité des lymphocytes, l'ICS pourrait être utilisé en complément de l'ELISpot permettant aussi d'avoir une donnée concernant la polyfonctionnalité de la réponse.

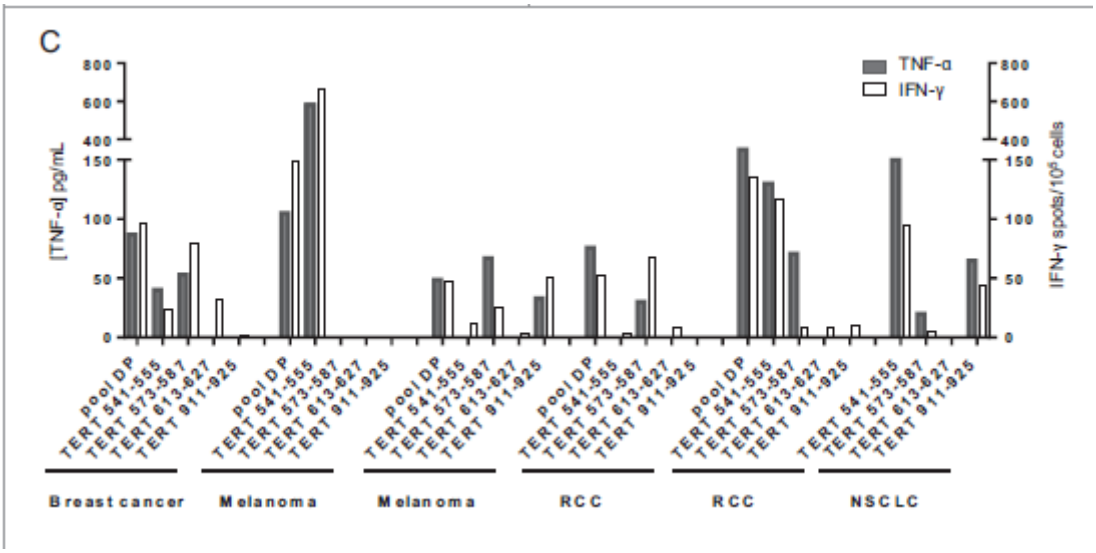


Figure 36 : Polarisation des réponses T CD4 spécifiques de TERT restreintes HLA-DP4. Issue de Laheurte et al, Annexe 3.

Une autre limite de la méthode d'ELISpot vient du fait qu'on ne connait pas la nature des cellules productrices d'IFN-γ. Sur ce critère l'ICS supplante l'ELISpot mais demeure une technique gourmande en cellules surtout si on souhaite tester la réactivité des lymphocytes contre plusieurs antigènes tumoraux.

Une possibilité serait de trier les LT CD4 avant de les cultiver avec les peptides ou d'utiliser des peptides restreints HLA de classe II préalablement validés pour être reconnus par les T CD4 (Kobayashi et Celis 2008). Cette dernière approche est celle déployée depuis plusieurs années par notre groupe pour palier à cette limite de l'ELISpot. Ainsi les 8 peptides dérivés de TERT utilisés dans le test ELISpot sont capables de se lier à plusieurs molécules HLA-DR et HLA-DP4 (Table 9, Godet et al., 2012b; Laheurte et al., 2016). Les réponses T CD4 spécifiques de ces peptides ne sont pas inhibées par le blocage par des anticorps anti-HLA classe I mais par les anti-DR et anti-DP4 (Godet, Laheurte, Galaine). De plus, les réponses T CD4 anti-TERT périphériques sont fortement corrélées au taux de lymphocytes CD4 totaux circulants mais indépendantes des CD8 totaux, argument qui souligne la robustesse du test. Par ailleurs, nous avons observé que dans cette cohorte de cancer du poumon, la fréquence des réponses T contre les antigènes tumoraux étudiés TERT, NY-ESO-1 et WT-1, se situent entre 35 et 40%. Ainsi, l'utilisation de 8 peptides dérivés de TERT nous permet d'obtenir des prévalences assez proches de celles des réponses T contre NY-ESO-1 ou WT-1 mesurées à l'aide de pools de 15 mers contenant une quarantaine de peptides pour chaque antigène. De plus, les séquences des peptides TERT utilisées dans notre test sont conservées dans les principales isoformes de TERT existantes retrouvées dans les cellules tumorales (Listerman et al., 2013).

La fréquence des réponses T naturelles spécifiques d'antigènes tumoraux est généralement très faible dans le sang (Costa-Nunes et al., 2019). Afin de permettre leur détection, nous avons réalisé au préalable de l'ELISpot IFN-γ, une amplification des LT spécifiques *in vitro* (IVS). Néanmoins, l'IVS peut être parfois considéré comme un biais car il introduit le risque de surestimer la fréquence des réponses T spécifiques d'antigènes, via un priming des cellules T naïves. Par ailleurs l'IVS entraine certains changements phénotypiques des lymphocytes ainsi que de possible changements au niveau de leurs fonctions cytotoxiques (Monsurrò et al., 2002). Cependant, il est décrit qu'une période d'expansion n'excédant pas 15 jours n'induirait pas de LT spécifiques issus de précurseurs naïfs et donc un meilleur reflet de la stimulation *in vivo* (Nagorsen et al., 2003). En effet, une étude réalisée par l'équipe de Tartour et al sur la détection de LT CD8 spécifiques du cytomégalovirus (CMV) a montré que des donneurs naïfs CMV ne développaient pas de réponses T anti-CMV après IVS de 6 jours (Godard et al., 2004). Ainsi, dans notre étude nous avons réalisé une courte période d'IVS de 6 jours en présence d'IL-2 et d'IL-7. En lien avec notre étude d'autres travaux similaires avaient utilisé une IVS d'une durée de 7 et 12 jours (Janssen et al., 2005; Peng et al., 2007; Trimble et al., 2010; Weide et al., 2012, 2014; Zelba et al., 2014; Bailur et al., 2015) (Table 8).

Des données du laboratoire non encore publiées ont révélé qu'après 48h d'IVS, nous détections rarement des LT spécifiques de tumeurs par ELISpot. En revanche les réponses anti-virales pouvaient être détectées après une IVS de 48h (Figure 37). L'étape d'IVS semble donc nécessaire à la détection de réponses T spontanées spécifiques d'antigènes de tumeurs dans le sang.

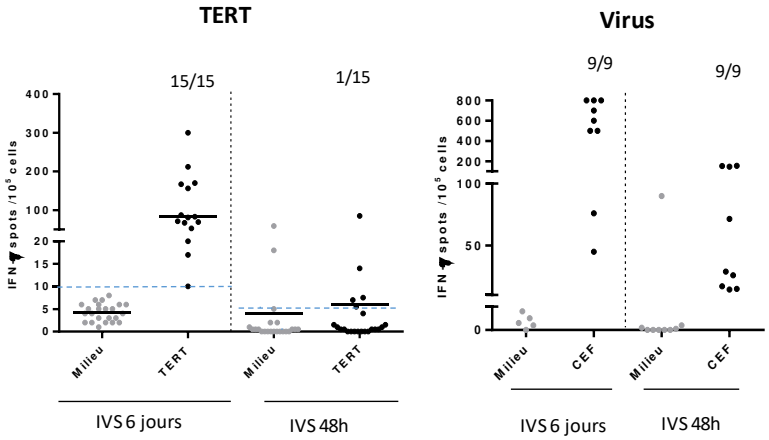


Figure 37 : Réponses T CD4 Th1 anti-TERT et anti-virales détectées par méthode ELISpot IFN-γ après IVS 6 jours versus 48h. Sélection de patients atteints de cancers du poumon avant tout traitement présentant des réponses CD4 Th1 anti-TERT et anti-virales positives après 6 jours d'IVS.

Techniques émergentes

L'émergence de nouvelles technologies d'analyse des sous-populations de cellules immunitaires, la cytométrie de masse CyTOF (Cytometry by time-of-flight mass spectrometry), ou l'analyse par la technologie Single cell ouvre des perspectives pour l'analyse des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs. Par exemple, le CyTOF a été décrit pour une application possible avec des tétramères (Newell et al., 2012; Bentzen et al., 2016).

Récemment, une nouvelle méthode permettant d'identifier des réponses T CD8 spécifiques d'antigènes basée sur l'activation des intégrines β2 (LFA1) a été décrite (Dimitrov et al., 2018). L'activation des intégrines β2 intervient après interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH (Walling and Kim, 2018). Cette activation se fait selon un procédé appelé « inside out », durant lequel l'intégrine change de conformation, elle passe d'une conformation fermée à une conformation ouverte laissant accessible le site de liaison à son ligand ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule). L'interaction des intégrines et de ICAM-1, va permettre la formation et la stabilisation de la synapse immunologique entre la cellule T et la cellule présentatrice d'antigène. Les auteurs à l'origine de cette méthode ont donc basé leur test sur la détection de cette interaction entre les intégrines et ICAM-1, mais comme cette interaction n'est pas stable, ils ont développé un multimère ICAM-1 fluorescent pouvant être détecté par cytométrie

en flux. Cette technique originale permet de détecter la fonctionnalité des cellules T spécifiques sans doser la production de cytokines mais en analysant un changement d'avidité qui survient dans les minutes après l'activation des CD8, et ne nécessitant pas de période de stimulation préalable (Gouttefangeas et al., 2019). Son utilisation pour l'analyse des réponses T naturelles spécifiques d'antigènes de tumeurs reste à évaluer ainsi que son éventuelle application pour l'analyse des LT CD4 spécifiques.

5. Relevance clinique de la réponse CD4 Th1 anti-TERT périphérique

Un résultat majeur de ce travail est le bon pronostic associé à la présence d'une réponse systémique T CD4 anti-TERT chez les patients atteints de cancer bronchique. Ainsi la présence d'une forte réponse Th1 anti-TERT préexistante avant tout traitement était associée significativement à une meilleure survie globale (médiane de survie non atteinte versus 12 mois P= 0,009).

Une analyse multivariée a montré que cette association avec la survie globale était indépendante du stade et du sous-type histologique du cancer bronchique. De plus, nous n'avons pas observé de corrélation significative avec les principales caractéristiques démographiques telles que l'âge, sexe, tabac, ni ou avec les principales altérations oncogéniques dans le cancer bronchique (EGFR, ALK, ROS1, KRAS, BRAF,…).

Ce bénéfice clinique était retrouvé chez les patients ayant un cancer localisé traité majoritairement par la chirurgie mais aussi au stade métastatique traité par chimiothérapie. Le type de traitement systémique reçu par les patients de stade métastatique ne semble pas être un facteur confondant puisque 91% d'entre eux avaient reçu une première ligne de traitement standard à base de doublet à sel de platine.

Ces résultats suggèrent un rôle protecteur de l'immunité Th1 anti-TERT dans le cancer bronchique alors que l'absence de cette réponse périphérique serait délétère.

La corrélation entre la réponse Th1 anti-TERT et le pronostic du cancer a été également retrouvée dans d'autres cancers par notre équipe (Table 10). Ainsi, dans une cohorte de 250 patients atteints de cancer colorectal métastatique et dans le mélanome (156 patients), la présence d'une réponse CD4 Th1 anti-TERT avant traitement était significativement associée à une amélioration de la survie globale chez ces patients (Figure 38, articles en préparation). Des résultats préliminaires dans le glioblastome montrent cette même tendance (Meynard Annal Oncol Esmo 2017) (Table 10).

Ces résultats sont en accord avec plusieurs données de la littérature qui avaient rapporté un rôle protecteur d'une signature CD4 Th1 intra-tumorale dans plusieurs cancers humains y compris dans le cancer du poumon (Ruffini et al., 2009; Suzuki et al., 2011; Fridman et al., 2012; Goc et al., 2014; Galon and Bruni, 2020).

Contrairement à l'analyse de l'infiltrat lymphocytaire T intra-tumoral, peu d'études ont évalué la relevance clinique des réponses T périphériques dirigées contre des antigènes tumoraux dans les cancers. Ainsi une association positive entre les réponses Th1 anti-tumorales périphériques et la survie a été décrite par différents groupes (Table 8). Par exemple, dans une cohorte d'une cinquantaine de patients atteints de cancer du poumon, Safi et al a montré que les patients ayant des LT anti-NYESO-1 présentaient une survie améliorée par rapport aux patients n'ayant pas cette réponse. Le bon pronostique des patients était également associé à une forte intensité de la réponse IFN-γ (Safi et al., 2017).

Cependant dans ces études, les réponses T CD4 et CD8 n'étaient pas souvent analysées séparément. Néanmoins certains travaux confirment l'association favorable de la réponse T CD4 spécifique d'antigènes de tumeur avec la clinique (Tatsumi et al., 2002; Peng et al., 2007; Seresini et al., 2007) (Table 8). Deux études parmi ces travaux concernant les réponses T périphériques anti-CEA et Melan-A dans le cancer colorectal et le mélanome avaient rapporté des résultats inverses (Betts et al., 2012; Zelba et al., 2014; Scurr et al., 2015). L'effet délétère des réponses T CD4 spécifiques de Melan-A a été attribué à leur polarisation paradoxales de type Th2 et Th17 (Zelba et al., 2014). Les réponses T CD8 anti-Melan-A étaient quant à elles associées à un bon pronostique, renforçant l'intérêt de sélectionner les peptides tumoraux avec attention quand il s'agit d'une analyse T CD4 spécifique.

L'ensemble de ces résultats souligne le rôle crucial des lymphocytes CD4 Th1 qui contrôlent l'immunité à médiation cellulaire anti-tumorale (Kim and Cantor, 2014; Borst et al., 2018).

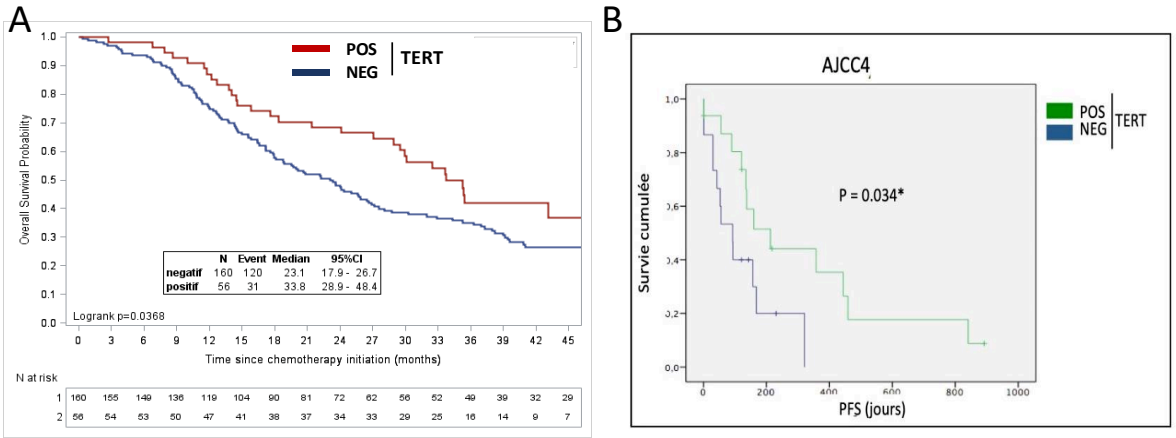


Figure 38 : Association entre la présence de la réponse CD4 Th1 naturelle spécifique de TERT mesurée avant traitement et la survie des patients atteints de cancer du côlon et mélanome. A, Survie globale dans une cohorte de 216 patients atteint de cancer du côlon métastatique (Epitope CRC02, NCT02817178), B. Survie sans progression dans une cohorte de patients atteints de mélanome (Lytelomel, NCT02838433).

Cancer	Nb patients	Réponses naturelles CD4 Th1 anti-TERT Frequences	Association avec la clinique	References
Cancer du poumon	88	35%	**Favorable**	Godet et al, Clin.Can.Res. 2012
Cancer du rein	23	49%	**Favorable**	Beziaud et al, Can.Res. 2016
Glioblastome	45	38%	En cours	
Cancer du sein	103	60%	En cours	
Pancréas	23	39%	Non évalué	
Cancer du canal anal	66	32%	**Favorable**	Kim et al, Lancet Oncol. 2018 Spehner et al, in preparation
Melanome	171	55%	**Favorable**	Nardin et al, in preparation
Cancer colorectal	74	24%	Non évalué	Loyon et al, Front. Immunol 2019
Cancer colorectal	149	30%	Non évalué	Galaine et al, Int.J.Cancer 2019
Cancer colorectal	216	26%	**Favorable**	Jary et al, in preparation
Cancer du poumon	170	35%	**Favorable**	Laheurte et al, Br.J.Cancer 2019

Table 10 : Synthèse des fréquences des réponses CD4 Th1 anti-TERT et de leur association avec les données de survie de patients atteints de différents cancers. Issu de différentes études menées au sein de notre équipe de recherche sur des cohortes de patients atteints de cancers

Nos résultats ont révélé une baisse graduelle de la réponses CD4 Th1 anti-TERT périphérique en fonction de l'évolution du stade tumoral. Ainsi cette immunité adaptative était présente chez 55% des patients au stade précoce (stades I-II), 37% au stade localement avancé (stade III) et 24% au stade IV. Ces données ont été confirmées en utilisant deux autres antigènes souvent exprimés dans le cancer du poumon tels que NY-ESO-1 et WT-1 (Kakimi et al., 2009). A l'inverse, la prévalence des réponse T anti-virales mesurées concomitamment par ELISpot IFN-γ était identique quelque soit le stade (80% de la population). Cette observation élimine une anomalie fonctionnelle du répertoire T mémoire circulant chez les patients non répondeurs.

Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature. Par exemple, dans le cancer du sein, une baisse des réponses T anti-MUC-1 et anti-HER-2 a été observée chez les tumeurs avancées comparé au formes localisées (Bailur et al., 2015; Janssen et al., 2017). Des résultats similaires ont été obtenus dans le cancer du foie, concernant les réponses T CD8 spécifiques des antigènes tels que APF, MAGEA-1 et NY-ESO-1 (Flecken et al., 2014).

L'ensemble de ces données suggèrent fortement que la présence d'une immunité Th1 anti-TAA circulante est progressivement inhibée au fur et à mesure que le cancer avance, contrairement à une réponse non spécifique de tumeur comme celle dirigée contre les virus.

Si on remet ces observations dans le contexte du concept d'immunosurveillance des cancers, nous formulons l'hypothèse que l'accumulation des mécanismes d'immunosuppression au stade avancé du cancer pourrait expliquer la faible prévalence des réponses Th1 anti-TERT

chez les patients présentant un cancer bronchique avancé. Cependant cette hypothèse ne peut être formellement validée qu'à l'échelle individuelle, par exemple lors de la récidive métastatique d'un cancer localisé.

Cependant certains résultats obtenus confortent nos hypothèses. En effet, des données préliminaires de l'équipe ont montré une forte prévalence des réponses Th1 anti-TERT (73%) chez des patients longs survivants après un cancer colorectal traité, alors que les réponses chez les patients métastatiques sont de 26% (Figure 39, Jary et al, article en préparation).

De plus, nous avons montré une évolution opposée entre la réponse Th1 anti-TERT et le taux circulant de lymphocytes T CD4 co-exprimant PD-1/TIM-3. Ainsi, le taux de ces lymphocytes T épuisés PD-1/TIM-3+ était 2 à 3 fois plus élevé chez patients de stade métastatique comparés à ceux de stades localisés. Or la réponse anti-TERT suit l'évolution inverse dans cette même population suggérant un effet négatif de l'épuisement lymphocytaire sur la réponse TERT comme discuté précédemment. De plus, nous avons montré qu'un fort taux de lymphocytes T PD-1/TIM-3+ circulants était associé à un mauvais pronostique. Nous avons observé que cette association négative avec la survie était particulièrement plus marquée avec le taux circulant des lymphocytes T CD4 exprimant TIM-3. De récentes études portant sur l'étude du microenvironnement immunitaire tumoral dans le cancer du poumon, ont montré que la co-expression de PD-1/TIM3 sur les TILs était associée à un mauvais pronostic (Thommen et al., 2015; Granier et al., 2017; Guo et al., 2018). Ceci peut s'expliquer par la perte des fonctions effectrices qui caractérisent les LT épuisés (Wherry and Kurachi, 2015). Dans ce sens, nous avons également montré une expression faible de Ki67 par les T CD4 PD-1/TIM3+ circulants traduisant leur incapacité prolifération.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la réponse CD4 Th1 anti-TERT mesurée dans le sang des patients peut être utilisée comme un biomarqueur intéressant pour évaluer de manière simple et dynamique la signature Th1 anti-tumorale dans les cancers. Par ailleurs, ces résultats supportent fortement le rationnel pour stimuler cette réponse T CD4 chez les patients. Ainsi, un vaccin thérapeutique anti-cancer dérivé de TERT appelé (UCPVax) capable d'induire des réponses CD4 Th1 anti-TERT efficaces *in vivo* (Dosset et al., 2012) est en cours d'évaluation dans le cancer du poumon métastatique (NCT02818426).

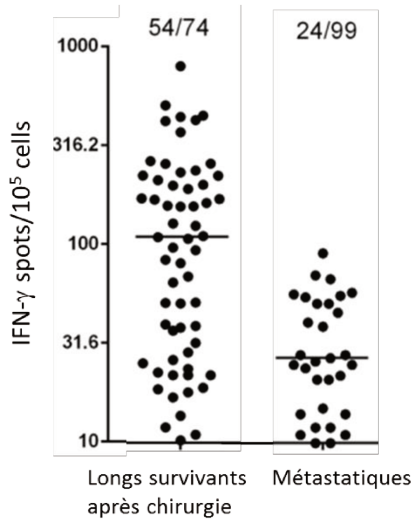


Figure 39 : Réponses CD4 Th1 anti-TERT chez des patients long survivants après chirurgie d'un cancer colorectal versus des patients métastatiques d'un cancer colorectal

6. Modulation des réponses CD4 Th1 anti-TERT par les traitements anticancéreux

Après avoir décrit les caractéristiques immunologiques et la signification clinique de la réponse naturelle Th1 anti-TERT mesurée avant l'initiation de toute thérapie y compris la chirurgie, nous avons abordé la question importante concernant l'évolution de cette réponse après traitement. Pour cela différentes études de cohortes de patients dans plusieurs cancers traités par des traitements cytotoxiques et par immunothérapies ont été mise en place au sein de notre équipe.

a. Influence des traitements cytotoxiques sur la réponse T

Les travaux pionniers de Laurence Zitvogel et Guido Kroemer ont apporté les preuves d'une interdépendance entre le système immunitaire et l'efficacité thérapeutique des chimiothérapies (Zitvogel et al., 2013). En effet, certains traitements cytotoxiques sont capables de stimuler les réponses immunitaires anti-tumorales notamment par l'induction d'une mort cellulaire dite immunogène (Galluzzi et al., 2015). Plusieurs travaux ont ainsi démontré le rôle majeur joué par le système immunitaire dans l'effet thérapeutique des chimiothérapies (Ladoire et al., 2011b; Bruchard et al., 2013; Limagne et al., 2016, 2019).

Bien que nous n'avons pas analysé l'effet du traitement sur la réponse Th1 anti-TERT dans notre cohorte, des études antérieures et en cours dans l'équipe démontrent une influence des traitements sur cette réponse.

Dans une étude pilote de l'équipe, menée dans le cancer du rein, il a été montré que le traitement par évérolimus, un inhibiteur de la voie mTOR, influence l'intensité de la réponse CD4 Th1 anti-TERT. En effet, une augmentation des lymphocytes Th1 anti-TERT a été constatée après traitement par évérolimus. Cette augmentation de la réponse anti-TERT était effective à partir de 2 mois de traitement et pouvait être cliniquement bénéfique chez certains patients (Thiery-Vuillemin et al., 2014; Beziaud et al., 2016).

Plus récemment, notre équipe a montré le bénéfice clinique induit par une polychimiothérapie associant, docétaxel, 5-fluoro-uracile (5-FU) et cisplatine (DCF), dans une cohorte prospective de patients atteints de cancer du canal anal HPV 16 positif. Le taux de rémission complète était spectaculaire environ 50% (31/62 pts) (Kim et al., 2018). Une étude ancillaire de cette étude avait pour objectif d'évaluer les réponses T CD4 anti- E7/E6 d'HPV16 et anti-TERT chez les patients par ELISpot IFN-γ. Ainsi, une amplification significative de la réponse anti-HPV et anti-TERT était observée après traitement DCF. De manière intéressante, les patients avec des réponses Th1 anti-TERT après traitement avaient une meilleure survie sans progression par comparaison au groupe de patients sans réponse anti-TERT (20,6 mois versus 10,1 mois). A l'inverse, la réponse Th1 anti-HPV 16 avant ou après traitement n'était significativement pas corrélée à une amélioration de la survie (Kim et al., 2018). Ces données suggèrent que la réactivation de la réponse Th1 anti-TERT *in vivo* après traitement contribue à l'efficacité du DCF. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'effet immunogène du DCF tels que la mort cellulaire immunogène (Docetaxel, Cisplatine), l'augmentation de la sensibilité des cellules à la lyse immunitaire (Cisplatine), la déplétion des MDSC (5FU, Cisplatine) (Kroemer et al., 2013; de Biasi et al., 2014; Galluzzi et al., 2015).

Une étude similaire est actuellement menée dans tout type de cancer du poumon (cohorte TeloCap 02, NCT02846103) dans le but d'étudier et comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation de la réponse CD4 Th1 anti-TERT par les traitements cytotoxiques. Cette cohorte prospective multicentrique inclura à terme 360 patients métastatiques éligibles à une chimiothérapie de 1ère ligne. Des résultats très préliminaires montrent que les doublets à base de sels de platine influencent différemment la réponse Th1 anti-TERT périphérique. En effet, nous observé que le doublet cisplatine-pémétrexed augmente significativement les lymphocytes T CD4 anti-TERT alors qu'un traitement par doublet de carbotaxol-paclitaxel semble être associé à une diminution de cette réponse (Figure 40).

Si ces résultats se confirment, ils pourront ouvrir des perspectives pour de nouvelles combinaisons par exemple mieux choisir les chimiothérapies qui créent un environnement immunitaire propice à l'action des immunothérapies (Patel and Minn, 2018).

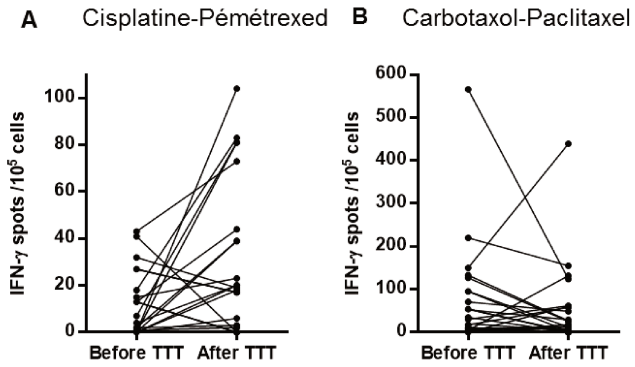


Figure 40 : Modulation des réponses CD4 Th1 anti-TERT après 3 mois de traitement de chimiothérapies chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules. A, Réponse anti-TERT avant et après Cisplatine-Pémétrexed. B, Réponse anti-TERT avant et après Carbotaxol-Paclitaxel.

b. Utilisation comme biomarqueur des immunothérapies.

Les travaux d'Alexander Huang ont permis de mettre en avant l'utilité d'un suivi des réponses immunitaires basé sur le sang. Dans ce travail, les auteurs avaient démontré que l'efficacité du traitement anti-PD1 est liée à l'amplification précoce (1-2 mois) de TCD8 PD1+Ki67+ circulants. Ils ont montré une homologie entre les clones T anti-tumoraux présents dans le sang et ceux isolés dans la tumeur du même patient (Huang et al., 2017). Une autre étude a également montré l'existence de similarités entre la spécificité clonale des TILs et les lymphocytes T périphériques dans le cancer du poumon (Guo et al., 2018). Ainsi la détection des lymphocytes T anti-tumoraux circulants pourrait refléter ce qui se passe dans la tumeur comme proposé par Chen & Mellmann dans la définition du cycle en 7 étapes de la réponse lymphocytaire T anti-cancer. Dans ce schéma, la réponse T anti-tumorale est décrite comme un processus dynamique au cours duquel le sang périphérique constitue le carrefour de passage des lymphocytes T anti-tumoraux migrants vers le lit tumoral et les organes lymphoïdes secondaires (Chen and Mellman, 2013, 2017). Plusieurs travaux, y compris ceux présentés dans cette thèse, confirment ce processus et renforcent nos hypothèses d'utiliser les réponses T anti-tumorales circulantes comme biomarqueur potentiel des immunothérapies.

Spitzer et al, ont clairement mis en évidence le rôle essentiel de la réponse immunitaire T CD4 systémique dans l'efficacité des immunothérapies. Ces auteurs ont montré qu'une sous-population de T CD4 Th1 activés de phénotype effecteur mémoire (CD4+Tbet+CD44+CD62L-CD27low) était associée à des réponses cliniques de patients sous immunothérapies (Spitzer et al., 2017).

D'autres équipes ont également rapporté une augmentation dans le sang périphérique des T CD4+ ICOS+ chez des patients traités par anti-CTLA4 (Liakou et al., 2008; Chen et al., 2009; Chaput et al., 2017). Cette expansion de cellules T CD4+ ICOS+ était associée à une

amélioration de la survie globale après anti-CTLA-4 (Carthon et al., 2010). Une équipe japonaise a rapporté une association positive entre l'expansion de T CD4 mémoires centraux (CD27+Fas-CD45RA-CCR7 +) dans le sang après un traitement anti-PD-1 et la réponse au traitement (Takeuchi et al., 2018).

Plus récemment, une équipe a rapporté le rôle prédictif d'une sous-population systémique de T CD4 CD28- effecteurs/mémoires avant traitement dans l'efficacité de traitement par anti-PD-1/PD-L1 (Zuazo et al., 2019). Dans une autre étude récente réalisée dans le cancer du poumon, les auteurs ont montré que les patients répondeurs à un traitement anti-PD-1 présentaient des taux circulants élevés de T CD4 $CD62L^{low}$ avant traitement. Cette sous-population $CD62L^{low}$ est caractéristique des LT ayant rencontrés l'antigène (Kagamu et al., 2019).

Bien que ces études décrivent différents phénotypes de T CD4 circulants, ces caractéristiques phénotypiques laissent à penser qu'elles correspondent à des T effecteurs et/ou mémoires ayant rencontré l'antigène.

Ainsi l'ensemble de ces études met en lumière un réel potentiel de l'analyse des réponses T CD4 systémiques comme biomarqueur de réponse aux immunothérapies.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'intérêt du suivi des réponses CD4 Th1 anti-TERT chez des patients traités par inhibiteurs de checkpoints anti-PD-1 (cohorte ITHER NCT02840058). L'analyse de la réponse anti-TERT était réalisée à 3 temps (avant traitement, à 1 et 3 mois).

Les premières analyses dans le cancer bronchique et le mélanome (n=57) montrent trois types d'évolution de la réponse CD4 Th1 anti-TERT périphérique ; à savoir une amplification, un maintien ou une perte (Figure 41A). La présence de cette réponse ne semble pas prédire la réponse aux anti-PD-1. En revanche, lorsque nous analysons la survie en fonction des 3 types de réponse immunitaire, les patients chez qui le traitement induit une amplification des lymphocytes T CD4 anti-TERT ont la meilleure évolution clinique sous anti-PD-1. A l'inverse la perte de cette réponse durant le traitement parait délétère (Figure 41B). Bien que ces résultats soient préliminaires, ils confirment le rôle protecteur de la réponse CD4 Th1 anti-TERT et soulignent son intérêt comme biomarqueur potentiel de réponse aux immunothérapies. De plus, l'effet positif de la réactivation *de novo* de la réponse Th1 anti-TERT par les traitements anti-PD-1 constituent un rationnel solide pour combiner le vaccin TERT en association avec les anti-PD-1 chez les patients.

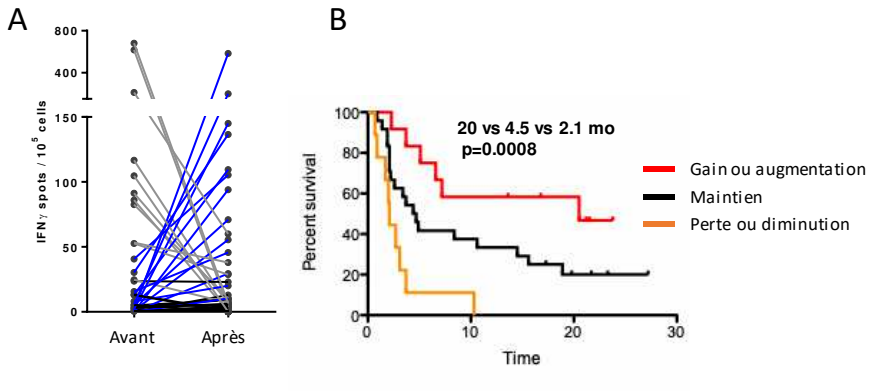


Figure 41 : Association entre l'évolution de la réponse T anti-TERT circulante et la survie des patients atteints de cancer du poumon et mélanome traités par anti-PD-1. A Intensité de la réponse T anti-TERT avant et après 3 mois de traitement. B, Association entre l'évolution de la réponse T anti-TERT (Gain ou augmentation, maintien, perte ou diminution) et la survie globale des patients issus de la cohorte ITHER (NCT 02840058).

La réactivation des réponses T périphériques spécifiques d'antigènes par les inhibiteurs de checkpoints a été déjà rapportée dans la littérature. Chez des patients atteints de mélanome et traités par anti-CTLA-4, une amélioration de la survie était observée chez ceux qui avaient une induction de réponses T CD8 anti-NY-ESO-1 ou dirigées contre plusieurs épitopes (Yuan et al., 2011; Kvistborg et al., 2014). Des observations similaires ont été rapportées par l'équipe de Dhodapkar montrant une association entre l'activation de réponses T anti-SOX-2 périphériques et la réponse clinique après anti-PD-1 dans le cancer du poumon (Dhodapkar et al., 2013). Une augmentation de la réactivité des lymphocytes T contre les néoantigènes a également été observée chez des patients traités par anti-PD-1 (Rizvi et al., 2015). L'ensemble de ces données soutien que la réactivation des réponses Th1 circulantes spécifiques d'antigènes tumoraux contribue à l'efficacité des immunothérapies.

Néanmoins, compte tenu de la spécificité tumorale des néoantigènes restreinte à l'échelle individuelle, on peut se poser la question de l'intérêt de l'analyse des réponses T contre les néoantigènes en tant que biomarqueur d'efficacité des immunothérapies. L'identification des néoantigènes chez un individu nécessite d'identifier les gènes mutés par séquençage du génome entier de la tumeur et de sélectionner les peptides dont les motifs devraient être présentés par les allèles HLA du patient. Or, seule une petite fraction de ces peptides mutés est effectivement présentée par le CMH (Schumacher and Schreiber, 2015). De plus, contrairement à un antigène non muté, l'expression des néoantigènes peut être perdue au cours du temps, car l'hétérogénéité génétique au sein des tumeurs peut rendre une partie des cellules tumorales moins dépendante d'une mutation oncogène donnée (Gerlinger et al., 2012). Ce qui n'est pas le cas pour les antigènes surexprimés dont la télomérase qui confère

un avantage essentiel à la survie des cellules tumorales et qui serait plus adapté au suivi des réponses anti-tumorales chez des patients traités par immunothérapies.

L'ensemble de ces analyses systémiques basées sur l'étude des LT CD4 constitue donc un faisceau d'argument qui renforce l'hypothèse que l'analyse des LT CD4 Th1 spécifiques de tumeurs pourrait être utilisée comme biomarqueur des inhibiteurs de checkpoints.

Conclusion

Dans ce travail de thèse, nous avons mis en lumière :

- La valeur pronostique de la réponse systémique CD4 Th1 anti-TERT dans les cancers
- L'avantage de mesurer la réponse CD4 Th1 anti-TERT dans le sang afin de pouvoir suivre de manière dynamique et non invasive le statut immunitaire du patient.
- L'intérêt du test ELISpot comme outil standardisé de mesure des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeur facile à déployer en routine et à large échelle.

L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt de l'analyse des réponses Th1 anti-TERT dans le sang périphérique chez des patients atteints de cancers et ouvre des perspectives pour son utilisation comme biomarqueur de l'immunité T adaptative anti-tumorale chez les patients atteints de cancer et pour évaluer l'efficacité des immunothérapies.

Bibliographie

Adeegbe, D.O., and Nishikawa, H. (2013). Natural and induced T regulatory cells in cancer. Front. Immunol. *4*, 190.

Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. Blood *114*, 1537–1544.

Ahrends, T., Bąbała, N., Xiao, Y., Yagita, H., van Eenennaam, H., and Borst, J. (2016). CD27 Agonism Plus PD-1 Blockade Recapitulates CD4+ T-cell Help in Therapeutic Anticancer Vaccination. Cancer Res. *76*, 2921–2931.

Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbała, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H., and Borst, J. (2017). CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. Immunity *47*, 848-861.e5.

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

Alspach, E., Lussier, D.M., Miceli, A.P., Kizhvatov, I., DuPage, M., Luoma, A.M., Meng, W., Lichti, C.F., Esaulova, E., Vomund, A.N., et al. (2019). MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. Nature *574*, 696–701.

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science *274*, 94–96.

Ameratunga, M., Asadi, K., Lin, X., Walkiewicz, M., Murone, C., Knight, S., Mitchell, P., Boutros, P., and John, T. (2016). PD-L1 and Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in Resected NSCLC. PloS One *11*, e0153954.

Andersen, R.S., Kvistborg, P., Frøsig, T.M., Pedersen, N.W., Lyngaa, R., Bakker, A.H., Shu, C.J., Straten, P. thor, Schumacher, T.N., and Hadrup, S.R. (2012). Parallel detection of antigen-specific T cell responses by combinatorial encoding of MHC multimers. Nat. Protoc. *7*, 891–902.

Anderson, A.C. (2014). Tim-3: An Emerging Target in the Cancer Immunotherapy Landscape. Cancer Immunol. Res. *2*, 393–398.

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.

Angell, T.E., Lechner, M.G., Smith, A.M., Martin, S.E., Groshen, S.G., Maceri, D.R., Singer, P.A., and Epstein, A.L. (2016). Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cells Predict Differentiated Thyroid Cancer Diagnosis and Extent. Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc. *26*, 381–389.

Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. Carcinogenesis *31*, 9–18.

Asadzadeh, Z., Mohammadi, H., Safarzadeh, E., Hemmatzadeh, M., Mahdian-shakib, A., Jadidi-Niaragh, F., Azizi, G., and Baradaran, B. (2017). The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. Cell. Immunol. *322*, 15–25.

Asemissen, A.M., Nagorsen, D., Keilholz, U., Letsch, A., Schmittel, A., Thiel, E., and Scheibenbogen, C. (2001). Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFNg for the quantification of antigen reactive T cells. J. Immunol. Methods 8.

Assi, H.I., Kamphorst, A.O., Moukalled, N.M., and Ramalingam, S.S. (2018). Immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer: Immunotherapy in NSCLC. Cancer *124*, 248–261.

Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 165–177.

Ayers, M., Lunceford, J., Nebozhyn, M., Murphy, E., Loboda, A., Kaufman, D.R., Albright, A., Cheng, J.D., Kang, S.P., Shankaran, V., et al. (2017). IFN-γ-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. J. Clin. Invest. *127*, 2930–2940.

Ayyoub, M., Dojcinovic, D., Pignon, P., Raimbaud, I., Schmidt, J., Luescher, I., and Valmori, D. (2010). Monitoring of NY-ESO-1 specific CD4+ T cells using molecularly defined MHC class II/His-tag-peptide tetramers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 7437–7442.

Babiak, A., Steinhauser, M., Götz, M., Herbst, C., Döhner, H., and Greiner, J. (2014). Frequent T cell responses against immunogenic targets in lung cancer patients for targeted immunotherapy. Oncol. Rep. *31*, 384–390.

Bacher, P., and Scheffold, A. (2013). Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells: Flow-Cytometric Analysis of Rare Antigen-Specific T Cells. Cytometry A *83A*, 692–701.

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

Bailur, J.K., Gueckel, B., Derhovanessian, E., and Pawelec, G. (2015). Presence of circulating Her2-reactive CD8 + T-cells is associated with lower frequencies of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells, and better survival in older breast cancer patients. Breast Cancer Res. *17*, 34.

Baitsch, L., Baumgaertner, P., Devêvre, E., Raghav, S.K., Legat, A., Barba, L., Wieckowski, S., Bouzourene, H., Deplancke, B., Romero, P., et al. (2011). Exhaustion of tumor-specific $CD8^+$ T cells in metastases from melanoma patients. J. Clin. Invest. *121*, 2350–2360.

Bakker, A.B., Schreurs, M.W., Tafazzul, G., de Boer, A.J., Kawakami, Y., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (1995). Identification of a novel peptide derived from the melanocyte-specific gp100 antigen as the dominant epitope recognized by an HLA-A2.1-restricted anti-melanoma CTL line. Int. J. Cancer *62*, 97–102.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.-J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., et al. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *27*, 6199–6206.

Beatty, G.L., and Vonderheide, R.H. (2008). Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. Expert Rev. Vaccines *7*, 881–887.

Bedard, P.L., Hansen, A.R., Ratain, M.J., and Siu, L.L. (2013). Tumour heterogeneity in the clinic. Nature *501*, 355–364.

Bellone, M., and Elia, A.R. (2017). Constitutive and acquired mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade in human cancer. Cytokine Growth Factor Rev. *0*.

Bentzen, A.K., Marquard, A.M., Lyngaa, R., Saini, S.K., Ramskov, S., Donia, M., Such, L., Furness, A.J.S., McGranahan, N., Rosenthal, R., et al. (2016). Large-scale detection of antigen-specific T cells using peptide-MHC-I multimers labeled with DNA barcodes. Nat. Biotechnol. *34*, 1037–1045.

Betts, G., Jones, E., Junaid, S., El-Shanawany, T., Scurr, M., Mizen, P., Kumar, M., Jones, S., Rees, B., Williams, G., et al. (2012). Suppression of tumour-specific CD4 $^{+}$ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. Gut *61*, 1163–1171.

Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Douek, D.C., Bonhoeffer, S., Brenchley, J.M., Casazza, J.P., Koup, R.A., and Picker, L.J. (2001). Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. J. Virol. *75*, 11983–11991.

Beziaud, L., Mansi, L., Ravel, P., Marie-Joseph, E.L., Laheurte, C., Rangan, L., Bonnefoy, F., Pallandre, J.-R., Boullerot, L., Gamonet, C., et al. (2016). Rapalogs Efficacy Relies on the Modulation of Antitumor T-cell Immunity. Cancer Res. *76*, 4100–4112.

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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *20*, 5384–5391.

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. Immunity *39*, 782–795.

Blank, C.U., Haanen, J.B., Ribas, A., and Schumacher, T.N. (2016). CANCER IMMUNOLOGY. The "cancer immunogram." Science *352*, 658–660.

Blank, C.U., Haining, W.N., Held, W., Hogan, P.G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R.C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N.P., et al. (2019). Defining "T cell exhaustion." Nat. Rev. Immunol. *19*, 665–674.

Bluestone, J.A., Mackay, C.R., O'Shea, J.J., and Stockinger, B. (2009). The functional plasticity of T cell subsets. Nat. Rev. Immunol. *9*, 811–816.

Böger, C., Behrens, H.-M., Mathiak, M., Krüger, S., Kalthoff, H., and Röcken, C. (2016). PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. Oncotarget *7*, 24269–24283.

Bonertz, A., Weitz, J., Pietsch, D.-H.K., Rahbari, N.N., Schlude, C., Ge, Y., Juenger, S., Vlodavsky, I., Khazaie, K., Jaeger, D., et al. (2009). Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. J. Clin. Invest. JCI39608.

Borah, S., Xi, L., Zaug, A.J., Powell, N.M., Dancik, G.M., Cohen, S.B., Costello, J.C., Theodorescu, D., and Cech, T.R. (2015). Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. Science *347*, 1006–1010.

Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C.J.M., and Kastenmüller, W. (2018). CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. Nat. Rev. Immunol.

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

Bowen, R.C., Little, N.A.B., Harmer, J.R., Ma, J., Mirabelli, L.G., Roller, K.D., Breivik, A.M., Signor, E., Miller, A.B., and Khong, H.T. (2017). Neutrophil-to-lymphocyte ratio as prognostic indicator in gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget *8*, 32171–32189.

Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., et al. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature *494*, 361–365.

Britten, C.M., Gouttefangeas, C., Welters, M.J.P., Pawelec, G., Koch, S., Ottensmeier, C., Mander, A., Walter, S., Paschen, A., Müller-Berghaus, J., et al. (2008). The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays. Cancer Immunol. Immunother. *57*, 289–302.

Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. Nat. Commun. *7*, 12150.

Brooks, S.E., Bonney, S.A., Lee, C., Publicover, A., Khan, G., Smits, E.L., Sigurdardottir, D., Arno, M., Li, D., Mills, K.I., et al. (2015). Application of the pMHC Array to Characterise Tumour Antigen Specific T Cell Populations in Leukaemia Patients at Disease Diagnosis. PloS One *10*, e0140483.

Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., et al. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat. Med. *19*, 57–64.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science *254*, 1643–1647.

Brunet, J.F., Denizot, F., Luciani, M.F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.G., and Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. Nature *328*, 267–270.

Buchholz, V.R., and Busch, D.H. (2019). Back to the Future: Effector Fate during T Cell Exhaustion. Immunity *51*, 970–972.

Buonaguro, L., Petrizzo, A., Tornesello, M.L., and Buonaguro, F.M. (2011). Translating Tumor Antigens into Cancer Vaccines. Clin. Vaccine Immunol. *18*, 23–34.

Cabel, L., Riva, F., Servois, V., Livartowski, A., Daniel, C., Rampanou, A., Lantz, O., Romano, E., Milder, M., Buecher, B., et al. (2017). Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *28*, 1996–2001.

Cabrita, R., Lauss, M., Sanna, A., Donia, M., Skaarup Larsen, M., Mitra, S., Johansson, I., Phung, B., Harbst, K., Vallon-Christersson, J., et al. (2020). Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. Nature *577*, 561–565.

Carthon, B.C., Wolchok, J.D., Yuan, J., Kamat, A., Ng Tang, D.S., Sun, J., Ku, G., Troncoso, P., Logothetis, C.J., Allison, J.P., et al. (2010). Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *16*, 2861–2871.

Casati, C., Dalerba, P., Rivoltini, L., Gallino, G., Deho, P., Rini, F., Belli, F., Mezzanzanica, D., Costa, A., Andreola, S., et al. (2003). The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. Cancer Res. *63*, 4507–4515.

Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R.N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. Nature *440*, 890–895.

Catarino, R., Araujo, A., Coelho, A., Gomes, M., Nogueira, A., Lopes, C., and Medeiros, R.M. (2010). Prognostic Significance of Telomerase Polymorphism in Non-Small Cell Lung Cancer. Clin. Cancer Res. *16*, 3706–3712.

Cha, E., Klinger, M., Hou, Y., Cummings, C., Ribas, A., Faham, M., and Fong, L. (2014). Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. Sci. Transl. Med. *6*, 238ra70.

Chan, T.A., Yarchoan, M., Jaffee, E., Swanton, C., Quezada, S.A., Stenzinger, A., and Peters, S. (2019). Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *30*, 44–56.

Chaput, N., and Théry, C. (2011). Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. Semin. Immunopathol. *33*, 419–440.

Chaput, N., Lepage, P., Coutzac, C., Soularue, E., Le Roux, K., Monot, C., Boselli, L., Routier, E., Cassard, L., Collins, M., et al. (2017). Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *28*, 1368–1379.

Chauvin, J.-M., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., Kirkwood, J.M., Chen, T.T., Maurer, M., Korman, A.J., et al. (2015). TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific $CD8^+$ T cells in melanoma patients. J. Clin. Invest. *125*, 2046–2058.

Che, Y.-Q., Feng, L., Rong, W.-Q., Shen, D., Wang, Q., Yang, L., Qi, J., and Huang, C.-Z. (2014). Correlation analysis of peripheral blood T cell subgroups, immunoglobulin and prognosis of early hepatocellular carcinoma after hepatectomy. Int. J. Clin. Exp. Med. *7*, 4282–4290.

Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., et al. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 5323–5337.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity *39*, 1–10.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature *541*, 321–330.

Chen, G., Huang, A.C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., et al. (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. Nature *560*, 382–386.

Chen, H., Liakou, C.I., Kamat, A., Pettaway, C., Ward, J.F., Tang, D.N., Sun, J., Jungbluth, A.A., Troncoso, P., Logothetis, C., et al. (2009). Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOShi T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 2729–2734.

Chen, P.-L., Roh, W., Reuben, A., Cooper, Z.A., Spencer, C.N., Prieto, P.A., Miller, J.P., Bassett, R.L., Gopalakrishnan, V., Wani, K., et al. (2016). Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. Cancer Discov. *6*, 827–837.

Cherfils-Vicini, J., Zizza, P., Gilson, E., and Biroccio, A. (2014). A novel pathway links telomeres to NK-cell activity: Implications for immunotherapy. Oncoimmunology *3*, e27358.

Chevaleyre, C., Benhamouda, N., Favry, E., Fabre, E., Mhoumadi, A., Nozach, H., Marcon, E., Cosler, G., Vinatier, E., Oudard, S., et al. (2015). The Tumor Antigen Cyclin B1 Hosts Multiple CD4 T Cell Epitopes Differently Recognized by Pre-Existing Naive and Memory Cells in Both Healthy and Cancer Donors. J. Immunol. *195*, 1891–1901.

Chiba, S., Baghdadi, M., Akiba, H., Yoshiyama, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Fujioka, Y., Ohba, Y., Gorman, J.V., Colgan, J.D., et al. (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. Nat. Immunol. *13*, 832–842.

Choi, J., Southworth, L.K., Sarin, K.Y., Venteicher, A.S., Ma, W., Chang, W., Cheung, P., Jun, S., Artandi, M.K., Shah, N., et al. (2008). TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. PLoS Genet. *4*, e10.

Chowdhury, S., Veyhl, J., Jessa, F., Polyakova, O., Alenzi, A., MacMillan, C., Ralhan, R., and Walfish, P.G. (2016). Programmed death-ligand 1 overexpression is a prognostic marker for aggressive papillary thyroid cancer and its variants. Oncotarget *7*, 32318–32328.

Chraa, D., Naim, A., Olive, D., and Badou, A. (2019). T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. J. Leukoc. Biol. *105*, 243–255.

Chudley, L., McCann, K.J., Coleman, A., Cazaly, A.M., Bidmon, N., Britten, C.M., van der Burg, S.H., Gouttefangeas, C., Jandus, C., Laske, K., et al. (2014). Harmonisation of short-term in vitro culture for the expansion of antigen-specific CD8+ T cells with detection by ELISPOT and HLA-multimer staining. Cancer Immunol. Immunother. *63*, 1199–1211.

Cierna, Z., Mego, M., Miskovska, V., Machalekova, K., Chovanec, M., Svetlovska, D., Hainova, K., Rejlekova, K., Macak, D., Spanik, S., et al. (2016). Prognostic value of programmed-death-1 receptor (PD-1) and its ligand 1 (PD-L1) in testicular germ cell tumors. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *27*, 300–305.

Cilloni, D., Gottardi, E., De Micheli, D., Serra, A., Volpe, G., Messa, F., Rege-Cambrin, G., Guerrasio, A., Divona, M., Lo Coco, F., et al. (2002). Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. Leukemia *16*, 2115–2121.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res. *66*, 9339–9344.

Coffelt, S.B., Chen, Y.-Y., Muthana, M., Welford, A.F., Tal, A.O., Scholz, A., Plate, K.H., Reiss, Y., Murdoch, C., De Palma, M., et al. (2011). Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 4183–4190.

Cole, D.K., Pumphrey, N.J., Boulter, J.M., Sami, M., Bell, J.I., Gostick, E., Price, D.A., Gao, G.F., Sewell, A.K., and Jakobsen, B.K. (2007). Human TCR-binding affinity is governed by MHC class restriction. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *178*, 5727–5734.

Condamine, T., Dominguez, G.A., Youn, J.-I., Kossenkov, A.V., Mony, S., Alicea-Torres, K., Tcyganov, E., Hashimoto, A., Nefedova, Y., Lin, C., et al. (2016). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. Sci. Immunol. *1*.

Cooper, W.A., Tran, T., Vilain, R.E., Madore, J., Selinger, C.I., Kohonen-Corish, M., Yip, P., Yu, B., O'Toole, S.A., McCaughan, B.C., et al. (2015). PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. Lung Cancer Amst. Neth. *89*, 181–188.

Costa-Nunes, C., Cachot, A., Bobisse, S., Arnaud, M., Genolet, R., Baumgaertner, P., Speiser, D.E., Sousa Alves, P.M., Sandoval, F., Adotévi, O., et al. (2019). High-throughput screening of human tumor-antigen specific CD4 T cells, including neo-antigen reactive T cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.

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

Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Hunt, D.F., and Slingluff, C.L. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. Science *264*, 716–719.

Cristescu, R., Mogg, R., Ayers, M., Albright, A., Murphy, E., Yearley, J., Sher, X., Liu, X.Q., Lu, H., Nebozhyn, M., et al. (2018). Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. Science *362*.

Crome, S.Q., Nguyen, L.T., Lopez-Verges, S., Yang, S.Y.C., Martin, B., Yam, J.Y., Johnson, D.J., Nie, J., Pniak, M., Yen, P.H., et al. (2017). A distinct innate lymphoid cell population regulates tumor-associated T cells. Nat. Med. *23*, 368–375.

Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? Immunity *30*, 626–635.

Czerkinsky, C.C., Nilsson, L.A., Nygren, H., Ouchterlony, O., and Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. J. Immunol. Methods *65*, 109–121.

Czystowska, M., Gooding, W., Szczepanski, M.J., Lopez-Abaitero, A., Ferris, R.L., Johnson, J.T., and Whiteside, T.L. (2013). The Immune Signature of CD8+CCR7+ T Cells in the Peripheral Circulation Associates with Disease Recurrence in Patients with HNSCC. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 889–899.

Daassi, D., Mahoney, K.M., and Freeman, G.J. (2020). The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. Nat. Rev. Immunol.

Damuzzo, V., Pinton, L., Desantis, G., Solito, S., Marigo, I., Bronte, V., and Mandruzzato, S. (2015). Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. Cytometry B Clin. Cytom. *88*, 77–91.

Dancey, J.E., Dobbin, K.K., Groshen, S., Jessup, J.M., Hruszkewycz, A.H., Koehler, M., Parchment, R., Ratain, M.J., Shankar, L.K., Stadler, W.M., et al. (2010). Guidelines for the Development and Incorporation of Biomarker Studies in Early Clinical Trials of Novel Agents. Clin. Cancer Res. *16*, 1745–1755.

Dannenmann, S.R., Hermanns, T., Bransi, A., Matter, C., von Boehmer, L., Stevanovic, S., Schraml, P., Moch, H., Knuth, A., and van den Broek, M. (2013). Spontaneous Peripheral T-cell Responses toward the Tumor-Associated Antigen Cyclin D1 in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Cancer Immunol. Res. *1*, 288–295.

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

Daste, A., Domblides, C., Gross-Goupil, M., Chakiba, C., Quivy, A., Cochin, V., de Mones, E., Larmonier, N., Soubeyran, P., and Ravaud, A. (2017). Immune checkpoint inhibitors and elderly people: A review. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *82*, 155–166.

Davies, R., Vogelsang, P., Jonsson, R., and Appel, S. (2016). An optimized multiplex flow cytometry protocol for the analysis of intracellular signaling in peripheral blood mononuclear cells. J. Immunol. Methods *436*, 58–63.

Davis, M.M., Altman, J.D., and Newell, E.W. (2011). Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide–MHC multimer analysis. Nat. Rev. Immunol. *11*, 551–558.

De Guillebon, E., Dardenne, A., Saldmann, A., Séguier, S., Tran, T., Paolini, L., Lebbe, C., and Tartour, E. (2020). Beyond the concept of cold and hot tumors for the development of novel predictive biomarkers and the rational design of immunotherapy combination. Int. J. Cancer.

De Palma, M., and Jain, R.K. (2017). CD4+ T Cell Activation and Vascular Normalization: Two Sides of the Same Coin? Immunity *46*, 773–775.

De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. Cancer Cell *8*, 211–226.

De Rosa, S.C. (2012). Vaccine applications of flow cytometry. Methods *57*, 383–391.

DeKruyff, R.H., Bu, X., Ballesteros, A., Santiago, C., Chim, Y.-L.E., Lee, H.-H., Karisola, P., Pichavant, M., Kaplan, G.G., Umetsu, D.T., et al. (2010). T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 1918–1930.

Delaunay, M., Guibert, N., Lusque, A., Farella, M., Boubekeur, N., Gouin, S., Dormoy, I., Fons, P., Esquerre, M., Favre, G., et al. (2018). Baseline circulating myeloid-derived suppressor cells and response to PD-1 inhibitor in non-small cell lung cancer patients. J. Clin. Oncol. *36*, 145–145.

Delyon, J., Mateus, C., Lefeuvre, D., Lanoy, E., Zitvogel, L., Chaput, N., Roy, S., Eggermont, A.M.M., Routier, E., and Robert, C. (2013). Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *24*, 1697–1703.

Dey, S., Kamil Reza, K., Wuethrich, A., Korbie, D., Ibn Sina, A.A., and Trau, M. (2019). Tracking antigen specific T-cells: Technological advancement and limitations. Biotechnol. Adv. *37*, 145–153.

Dhodapkar, K.M., Gettinger, S.N., Das, R., Zebroski, H., and Dhodapkar, M.V. (2013). SOX2-specific adaptive immunity and response to immunotherapy in non-small cell lung cancer. OncoImmunology *2*, e25205.

Di Giacomo, A.M., Ascierto, P.A., Queirolo, P., Pilla, L., Ridolfi, R., Santinami, M., Testori, A., Simeone, E., Guidoboni, M., Maurichi, A., et al. (2015). Three-year follow-up of advanced melanoma patients who received ipilimumab plus fotemustine in the Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT)-M1 phase II study. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *26*, 798–803.

Diaz-Montero, C.M., Finke, J., and Montero, A.J. (2014). Myeloid derived suppressor cells in cancer: therapeutic, predictive, and prognostic implications. Semin. Oncol. *41*, 174–184.

Dimitrov, S., Gouttefangeas, C., Besedovsky, L., Jensen, A.T.R., Chandran, P.A., Rusch, E., Businger, R., Schindler, M., Lange, T., Born, J., et al. (2018). Activated integrins identify functional antigen-specific CD8 $^{+}$ T cells within minutes after antigen stimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. *115*, E5536–E5545.

Djenidi, F., Adam, J., Goubar, A., Durgeau, A., Meurice, G., de Montpréville, V., Validire, P., Besse, B., and Mami-Chouaib, F. (2015). CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *194*, 3475–3486.

Dolton, G., Lissina, A., Skowera, A., Ladell, K., Tungatt, K., Jones, E., Kronenberg-Versteeg, D., Akpovwa, H., Pentier, J.M., Holland, C.J., et al. (2014). Comparison of peptide-major histocompatibility complex tetramers and dextramers for the identification of antigen-specific T cells: Comparison of pMHC-I tetramers and dextramers. Clin. Exp. Immunol. *177*, 47–63.

Dolton, G., Tungatt, K., Lloyd, A., Bianchi, V., Theaker, S.M., Trimby, A., Holland, C.J., Donia, M., Godkin, A.J., Cole, D.K., et al. (2015). More tricks with tetramers: a practical guide to staining T cells with peptide–MHC multimers. Immunology *146*, 11–22.

Dolton, G., Zervoudi, E., Rius, C., Wall, A., Thomas, H.L., Fuller, A., Yeo, L., Legut, M., Wheeler, S., Attaf, M., et al. (2018). Optimized Peptide–MHC Multimer Protocols for Detection and Isolation of Autoimmune T-Cells. Front. Immunol. *9*.

Dosset, M., Godet, Y., Vauchy, C., Beziaud, L., Lone, Y.C., Sedlik, C., Liard, C., Levionnois, E., Clerc, B., Sandoval, F., et al. (2012). Universal cancer peptide-based therapeutic vaccine breaks tolerance against telomerase and eradicates established tumor. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *18*, 6284–6295.

Dosset, M., Vauchy, C., Beziaud, L., Adotevi, O., and Godet, Y. (2013). Universal tumor-reactive helper peptides from telomerase as new tools for anticancer vaccination. Oncoimmunology *2*, e23430.

Duechting, A., Przybyla, A., Kuerten, S., and Lehmann, P.V. (2017). Delayed Activation Kinetics of Th2- and Th17 Cells Compared to Th1 Cells. Cells *6*.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat. Immunol. *3*, 991–998.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. Annu. Rev. Immunol. *22*, 329–360.

DuPage, M., and Bluestone, J.A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. Nat. Rev. Immunol. *16*, 149–163.

DuPage, M., Cheung, A.F., Mazumdar, C., Winslow, M.M., Bronson, R., Schmidt, L.M., Crowley, D., Chen, J., and Jacks, T. (2011). Endogenous T cell responses to antigens expressed in lung adenocarcinomas delay malignant tumor progression. Cancer Cell *19*, 72–85.

DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L.M., Cheung, A.F., and Jacks, T. (2012). Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. Nature *482*, 405–409.

Dutoit, V., Rubio-Godoy, V., Doucey, M.-A., Batard, P., Liénard, D., Rimoldi, D., Speiser, D., Guillaume, P., Cerottini, J.-C., Romero, P., et al. (2002). Functional avidity of tumor antigen-specific CTL recognition directly correlates with the stability of MHC/peptide multimer binding to TCR. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *168*, 1167–1171.

Eckel-Passow, J.E., Lachance, D.H., Molinaro, A.M., Walsh, K.M., Decker, P.A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M.L., Smirnov, I.V., et al. (2015). Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. N. Engl. J. Med. *372*, 2499–2508.

Ernst, P.B., Garrison, J.C., and Thompson, L.F. (2010). Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 1993–1998.

Fanoni, D., Tavecchio, S., Recalcati, S., Balice, Y., Venegoni, L., Fiorani, R., Crosti, C., and Berti, E. (2011). New monoclonal antibodies against B-cell antigens: possible new strategies for diagnosis of primary cutaneous B-cell lymphomas. Immunol. Lett. *134*, 157–160.

Feau, S., Garcia, Z., Arens, R., Yagita, H., Borst, J., and Schoenberger, S.P. (2012). The $CD4^+$ T-cell help signal is transmitted from APC to $CD8^+$ T-cells via CD27-CD70 interactions. Nat. Commun. *3*, 948.

Fehrenbacher, L., Spira, A., Ballinger, M., Kowanetz, M., Vansteenkiste, J., Mazieres, J., Park, K., Smith, D., Artal-Cortes, A., Lewanski, C., et al. (2016). Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. Lancet Lond. Engl. *387*, 1837–1846.

Ferrucci, P.F., Gandini, S., Battaglia, A., Alfieri, S., Di Giacomo, A.M., Giannarelli, D., Cappellini, G.C.A., De Galitiis, F., Marchetti, P., Amato, G., et al. (2015). Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of ipilimumab-treated metastatic melanoma patients. Br. J. Cancer *112*, 1904–1910.

Ferrucci, P.F., Ascierto, P.A., Pigozzo, J., Del Vecchio, M., Maio, M., Antonini Cappellini, G.C., Guidoboni, M., Queirolo, P., Savoia, P., Mandalà, M., et al. (2016). Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *27*, 732–738.

Filatenkov, A.A., Jacovetty, E.L., Fischer, U.B., Curtsinger, J.M., Mescher, M.F., and Ingulli, E. (2005). CD4 T cell-dependent conditioning of dendritic cells to produce IL-12 results in CD8-mediated graft rejection and avoidance of tolerance. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 6909–6917.

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

Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. J. Exp. Med. *207*, 2175–2186.

Francisco, L.M., Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunol. Rev. *236*, 219–242.

Freer, G., and Rindi, L. (2013). Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: Basic principles and recent advances. Methods *61*, 30–38.

Frelau, A., Pracht, M., Le Sourd, S., Lespagnol, A., Corre, R., Ménard, C., Tarte, K., Mosser, J., and Edeline, J. (2018). Biomarqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immuns. Bull. Cancer (Paris) *105*, S80–S91.

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

Fridman, W.H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C., and Kroemer, G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. Nat. Rev. Clin. Oncol. *14*, 717–734.

Fumet, J.-D., Richard, C., Ledys, F., Klopfenstein, Q., Joubert, P., Routy, B., Truntzer, C., Gagné, A., Hamel, M.-A., Guimaraes, C.F., et al. (2018). Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. Br. J. Cancer *119*, 950–960.

Fusi, A., Festino, L., Botti, G., Masucci, G., Melero, I., Lorigan, P., and Ascierto, P.A. (2015). PD-L1 expression as a potential predictive biomarker. Lancet Oncol. *16*, 1285–1287.

Gabrilovich, D.I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. Cancer Immunol. Res. *5*, 3–8.

Galaine, J., Kellermann, G., Guillaume, Y., Boidot, R., Picard, E., Loyon, R., Queiroz, L., Boullerot, L., Beziaud, L., Jary, M., et al. (2016). Heparan Sulfate Proteoglycans Promote Telomerase Internalization and MHC Class II Presentation on Dendritic Cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *197*, 1597–1608.

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

Galon, J., and Bruni, D. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. Nat. Rev. Drug Discov. *18*, 197–218.

Galon, J., and Bruni, D. (2020). Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. Immunity *52*, 55–81.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science *313*, 1960–1964.

Galon, J., Pagès, F., Marincola, F.M., Thurin, M., Trinchieri, G., Fox, B.A., Gajewski, T.F., and Ascierto, P.A. (2012). The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. J. Transl. Med. *10*, 1.

Gandara, D.R., Paul, S.M., Kowanetz, M., Schleifman, E., Zou, W., Li, Y., Rittmeyer, A., Fehrenbacher, L., Otto, G., Malboeuf, C., et al. (2018). Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. Nat. Med. *24*, 1441–1448.

Gao, J., Shi, L.Z., Zhao, H., Chen, J., Xiong, L., He, Q., Chen, T., Roszik, J., Bernatchez, C., Woodman, S.E., et al. (2016). Loss of IFN-γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. Cell *167*, 397-404.e9.

Gao, X., Zhu, Y., Li, G., Huang, H., Zhang, G., Wang, F., Sun, J., Yang, Q., Zhang, X., and Lu, B. (2012). TIM-3 Expression Characterizes Regulatory T Cells in Tumor Tissues and Is Associated with Lung Cancer Progression. PLoS ONE *7*, e30676.

Garnelo, M., Tan, A., Her, Z., Yeong, J., Lim, C.J., Chen, J., Lim, K.H., Weber, A., Chow, P., Chung, A., et al. (2017). Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular carcinoma. Gut *66*, 342–351.

Garofalo, A., Sholl, L., Reardon, B., Taylor-Weiner, A., Amin-Mansour, A., Miao, D., Liu, D., Oliver, N., MacConaill, L., Ducar, M., et al. (2016). The impact of tumor profiling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine. Genome Med. *8*, 79.

Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., et al. (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. *372*, 2018–2028.

Geiger, R., Duhen, T., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. J. Exp. Med. *206*, 1525–1534.

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N. Engl. J. Med. *366*, 883–892.

Ghosh, A., Saginc, G., Leow, S.C., Khattar, E., Shin, E.M., Yan, T.D., Wong, M., Zhang, Z., Li, G., Sung, W.-K., et al. (2012). Telomerase directly regulates NF-κB-dependent transcription. Nat. Cell Biol. *14*, 1270–1281.

Gibney, G.T., Weiner, L.M., and Atkins, M.B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. Lancet Oncol. *17*, e542–e551.

Giraldo, N.A., Becht, E., Pagès, F., Skliris, G., Verkarre, V., Vano, Y., Mejean, A., Saint-Aubert, N., Lacroix, L., Natario, I., et al. (2015). Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *21*, 3031–3040.

Giraldo, N.A., Becht, E., Vano, Y., Petitprez, F., Lacroix, L., Validire, P., Sanchez-Salas, R., Ingels, A., Oudard, S., Moatti, A., et al. (2017). Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *23*, 4416–4428.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer Res. *69*, 2000–2009.

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. Cancer Res. *74*, 705–715.

Godard, B., Gazagne, A., Gey, A., Baptiste, M., Vingert, B., Pegaz-Fiornet, B., Strompf, L., Fridman, W.H., Glotz, D., and Tartour, E. (2004). Optimization of an elispot assay to detect cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes. Hum. Immunol. *65*, 1307–1318.

Godet, Y., Dosset, M., Borg, C., and Adotevi, O. (2012a). Is preexisting antitumor CD4 T cell response indispensable for the chemotherapy induced immune regression of cancer? Oncoimmunology *1*, 1617–1619.

Godet, Y., Fabre, E., Dosset, M., Lamuraglia, M., Levionnois, E., Ravel, P., Benhamouda, N., Cazes, A., Le Pimpec-Barthes, F., Gaugler, B., et al. (2012b). Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *18*, 2943–2953.

Goebel, S.U., Iwamoto, M., Raffeld, M., Gibril, F., Hou, W., Serrano, J., and Jensen, R.T. (2002). Her-2/neu expression and gene amplification in gastrinomas: correlations with tumor biology, growth, and aggressiveness. Cancer Res. *62*, 3702–3710.

González-Suárez, E., Samper, E., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2000). Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. Nat. Genet. *26*, 114–117.

Gopalakrishnan, V., Spencer, C.N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M.C., Karpinets, T.V., Prieto, P.A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S.C., et al. (2018). Gut microbiome modulates response to anti–PD-1 immunotherapy in melanoma patients. Science *359*, 97–103.

Gordon, S.R., Maute, R.L., Dulken, B.W., Hutter, G., George, B.M., McCracken, M.N., Gupta, R., Tsai, J.M., Sinha, R., Corey, D., et al. (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. Nature *545*, 495–499.

Gouttefangeas, C., Schuhmacher, J., and Dimitrov, S. (2019). Adhering to adhesion: assessing integrin conformation to monitor T cells. Cancer Immunol. Immunother. *68*, 1855–1863.

Granier, C., Dariane, C., Combe, P., Verkarre, V., Urien, S., Badoual, C., Roussel, H., Mandavit, M., Ravel, P., Sibony, M., et al. (2017). Tim-3 Expression on Tumor-Infiltrating PD-1(+)CD8(+) T Cells Correlates with Poor Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. Cancer Res. *77*, 1075–1082.

Granier, C., Gey, A., Dariane, C., Mejean, A., Timsit, M.-O., Blanc, C., Verkarre, V., Radulescu, C., Fabre, E., Vano, Y., et al. (2018). Tim-3: Biomarqueur et cible thérapeutique en cancérologie. médecine/sciences *34*, 231–237.

Gray, S.M., Kaech, S.M., and Staron, M.M. (2014). The interface between transcriptional and epigenetic control of effector and memory $CD8^+$ T-cell differentiation. Immunol. Rev. *261*, 157–168.

Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell *43*, 405–413.

Greyer, M., Whitney, P.G., Stock, A.T., Davey, G.M., Tebartz, C., Bachem, A., Mintern, J.D., Strugnell, R.A., Turner, S.J., Gebhardt, T., et al. (2016). T Cell Help Amplifies Innate Signals in CD8(+) DCs for Optimal CD8(+) T Cell Priming. Cell Rep. *14*, 586–597.

Griffioen, M. (2006). Detection and Functional Analysis of CD8+ T Cells Specific for PRAME: a Target for T-Cell Therapy. Clin. Cancer Res. *12*, 3130–3136.

Guo, X., Zhang, Y., Zheng, L., Zheng, C., Song, J., Zhang, Q., Kang, B., Liu, Z., Jin, L., Xing, R., et al. (2018). Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. Nat. Med. *24*, 978–985.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). $CD4^+$ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. J. Clin. Invest. *123*, 2873–2892.

Hadrup, S.R., Bakker, A.H., Shu, C.J., Andersen, R.S., van Veluw, J., Hombrink, P., Castermans, E., Thor Straten, P., Blank, C., Haanen, J.B., et al. (2009). Parallel detection of antigen-specific T-cell responses by multidimensional encoding of MHC multimers. Nat. Methods *6*, 520–526.

Hadrup, S.R., Maurer, D., Laske, K., Frøsig, T.M., Andersen, S.R., Britten, C.M., van der Burg, S.H., Walter, S., and Gouttefangeas, C. (2015). Cryopreservation of MHC multimers: Recommendations for quality assurance in detection of antigen specific T cells. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. *87*, 37–48.

Halim, L., Romano, M., McGregor, R., Correa, I., Pavlidis, P., Grageda, N., Hoong, S.-J., Yuksel, M., Jassem, W., Hannen, R.F., et al. (2017). An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. Cell Rep. *20*, 757–770.

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

Harley, C.B. (2008). Telomerase and cancer therapeutics. Nat. Rev. Cancer *8*, 167–179.

Havel, J.J., Chowell, D., and Chan, T.A. (2019). The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. Nat. Rev. Cancer *19*, 133–150.

Heemskerk, B., Kvistborg, P., and Schumacher, T.N.M. (2012). The cancer antigenome. EMBO J. *32*, 194–203.

Hegazy, A.N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Fröhlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D.D., Radbruch, A., and Löhning, M. (2010). Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. Immunity *32*, 116–128.

Heidenreich, B., Rachakonda, P.S., Hemminki, K., and Kumar, R. (2014). TERT promoter mutations in cancer development. Curr. Opin. Genet. Dev. *24*, 30–37.

Helfrich, I., Edler, L., Sucker, A., Thomas, M., Christian, S., Schadendorf, D., and Augustin, H.G. (2009). Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 1384–1392.

Helmink, B.A., Reddy, S.M., Gao, J., Zhang, S., Basar, R., Thakur, R., Yizhak, K., Sade-Feldman, M., Blando, J., Han, G., et al. (2020). B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. Nature *577*, 549–555.

Herbst, R.S., Soria, J.-C., Kowanetz, M., Fine, G.D., Hamid, O., Gordon, M.S., Sosman, J.A., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Gettinger, S.N., et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature *515*, 563–567.

Higgs, B.W., Morehouse, C.A., Streicher, K., Brohawn, P.Z., Pilataxi, F., Gupta, A., and Ranade, K. (2018). Interferon Gamma Messenger RNA Signature in Tumor Biopsies Predicts Outcomes in Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma or Urothelial Cancer Treated with Durvalumab. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *24*, 3857–3866.

Hirsch, L., Zitvogel, L., Eggermont, A., and Marabelle, A. (2019). PD-Loma: a cancer entity with a shared sensitivity to the PD-1/PD-L1 pathway blockade. Br. J. Cancer *120*, 3–5.

Hoffmeyer, K., Raggioli, A., Rudloff, S., Anton, R., Hierholzer, A., Del Valle, I., Hein, K., Vogt, R., and Kemler, R. (2012). Wnt/β-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. Science *336*, 1549–1554.

Holopainen, T., Saharinen, P., D'Amico, G., Lampinen, A., Eklund, L., Sormunen, R., Anisimov, A., Zarkada, G., Lohela, M., Heloterä, H., et al. (2012). Effects of angiopoietin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis. J. Natl. Cancer Inst. *104*, 461–475.

Hong, A.M., Vilain, R.E., Romanes, S., Yang, J., Smith, E., Jones, D., Scolyer, R.A., Lee, C.S., Zhang, M., and Rose, B. (2016). PD-L1 expression in tonsillar cancer is associated with human papillomavirus positivity and improved survival: implications for anti-PD1 clinical trials. Oncotarget *7*, 77010–77020.

Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P.S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kadel, S., Moll, I., Nagore, E., Hemminki, K., et al. (2013). TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. Science *339*, 959–961.

Horton, H., Thomas, E.P., Stucky, J.A., Frank, I., Moodie, Z., Huang, Y., Chiu, Y.-L., McElrath, M.J., and De Rosa, S.C. (2007). Optimization and validation of an 8-color intracellular cytokine staining (ICS) assay to quantify antigen-specific T cells induced by vaccination. J. Immunol. Methods *323*, 39–54.

Huang, A., Zhang, B., Wang, B., Zhang, F., Fan, K.-X., and Guo, Y.-J. (2013). Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. Cancer Immunol. Immunother. CII *62*, 1439–1451.

Huang, A.C., Postow, M.A., Orlowski, R.J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., Xu, W., Harmon, S., Giles, J.R., Wenz, B., et al. (2017). T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. Nature *545*, 60–65.

Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. Immunity *21*, 503–513.

Huang, D.-S., Wang, Z., He, X.-J., Diplas, B.H., Yang, R., Killela, P.J., Meng, Q., Ye, Z.-Y., Wang, W., Jiang, X.-T., et al. (2015a). Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *51*, 969–976.

Huang, H., Bhat, A., Woodnutt, G., and Lappe, R. (2010). Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. Nat. Rev. Cancer *10*, 575–585.

Huang, J., Zeng, X., Sigal, N., Lund, P.J., Su, L.F., Huang, H., Chien, Y., and Davis, M.M. (2016). Detection, phenotyping, and quantification of antigen-specific T cells using a peptide-MHC dodecamer. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, E1890–E1897.

Huang, Y.-H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A.C., Gandhi, A., Russell, A., Dougan, S.K., Petersen, B.-S., Melum, E., Pertel, T., et al. (2015b). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. Nature *517*, 386–390.

Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., et al. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. Science *355*, 1428–1433.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. *11*, 3887–3895.

Ishii, H., Azuma, K., Kawahara, A., Yamada, K., Imamura, Y., Tokito, T., Kinoshita, T., Kage, M., and Hoshino, T. (2015). Significance of programmed cell death-ligand 1 expression and its association with survival in patients with small cell lung cancer. J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer *10*, 426–430.

Israyelyan, A., La Rosa, C., Tsai, W., Kaltcheva, T., Srivastava, T., Aquino, L., Li, J., Kim, Y., Palmer, J., Streja, L., et al. (2013). Detection and preliminary characterization of CD8+T lymphocytes specific for Wilms' tumor antigen in patients with non-Hodgkin lymphoma. Leuk. Lymphoma *54*, 2490–2499.

Jaimes, M.C., Maecker, H.T., Yan, M., Maino, V.C., Hanley, M.B., Greer, A., Darden, J.M., and D'Souza, M.P. (2011). Quality assurance of intracellular cytokine staining assays: analysis of multiple rounds of proficiency testing. J. Immunol. Methods *363*, 143–157.

Janetzki, S., Panageas, K.S., Ben-Porat, L., Boyer, J., Britten, C.M., Clay, T.M., Kalos, M., Maecker, H.T., Romero, P., Yuan, J., et al. (2008). Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). Cancer Immunol. Immunother. *57*, 303–315.

Janetzki, S., Rueger, M., and Dillenbeck, T. (2014). Stepping up ELISpot: Multi-Level Analysis in FluoroSpot Assays. 14.

Janetzki, S., Price, L., Schroeder, H., Britten, C.M., Welters, M.J.P., and Hoos, A. (2015). Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays. Nat. Protoc. *10*, 1098–1115.

Jansen, D.T.S.L., Ramnoruth, N., Loh, K.L., Rossjohn, J., Reid, H.H., Nel, H.J., and Thomas, R. (2018). Flow Cytometric Clinical Immunomonitoring Using Peptide–MHC Class II Tetramers: Optimization of Methods and Protocol Development. Front. Immunol. *9*, 8.

Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R., and Schoenberger, S.P. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. Nature *434*, 88–93.

Janssen, N., Fortis, S.P., Speigl, L., Haritos, C., Sotiriadou, N.N., Sofopoulos, M., Arnogiannaki, N., Stavropoulos-Giokas, C., Dinou, A., Perez, S., et al. (2017). Peripheral T cell responses to tumour antigens are associated with molecular, immunogenetic and cellular features of breast cancer patients. Breast Cancer Res. Treat. *161*, 51–62.

Jary, M., Vernerey, D., Lecomte, T., Dobi, E., Ghiringhelli, F., Monnien, F., Godet, Y., Kim, S., Bouché, O., Fratte, S., et al. (2015). Prognostic value of angiopoietin-2 for death risk stratification in patients with metastatic colorectal carcinoma. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *24*, 603–612.

Jennes, W., Kestens, L., Nixon, D.F., and Shacklett, B.L. (2002). Enhanced ELISPOT detection of antigen-specific T cell responses from cryopreserved specimens with addition of both IL-7 and IL-15—the Amplispot assay. J. Immunol. Methods *270*, 99–108.

Jin, H.-T., Anderson, A.C., Tan, W.G., West, E.E., Ha, S.-J., Araki, K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Ahmed, R. (2010a). Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 14733–14738.

Jin, S., Xu, B., Yu, L., Fu, Y., Wu, H., Fan, X., Wei, J., and Liu, B. (2017). The PD-1, PD-L1 expression and CD3+ T cell infiltration in relation to outcome in advanced gastric signet-ring cell carcinoma, representing a potential biomarker for immunotherapy. Oncotarget *8*, 38850–38862.

Jin, X., Beck, S., Sohn, Y.-W., Kim, J.-K., Kim, S.-H., Yin, J., Pian, X., Kim, S.-C., Choi, Y.-J., and Kim, H. (2010b). Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor. Exp. Mol. Med. *42*, 574–582.

Jönsson, P., Southcombe, J.H., Santos, A.M., Huo, J., Fernandes, R.A., McColl, J., Lever, M., Evans, E.J., Hudson, A., Chang, V.T., et al. (2016). Remarkably low affinity of CD4/peptide-major histocompatibility complex class II protein interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 5682–5687.

Jordan, K.R., Amaria, R.N., Ramirez, O., Callihan, E.B., Gao, D., Borakove, M., Manthey, E., Borges, V.F., and McCarter, M.D. (2013). Myeloid-derived suppressor cells are associated with disease progression and decreased overall survival in advanced-stage melanoma patients. Cancer Immunol. Immunother. CII *62*, 1711–1722.

Joseph, E.L.M., Laheurte, C., Jary, M., Boullerot, L., Asgarov, K., Gravelin, E., Bouard, A., Rangan, L., Dosset, M., Borg, C., et al. (2019). Immunoregulation and Clinical Implications of ANGPT2/TIE2+ M-MDSC Signature in Non–Small Cell Lung Cancer. Cancer Immunol. Res.

Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., and Rieger, C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J. Immunol. Methods *159*, 197–207.

Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. Nat. Rev. Immunol. *12*, 749–761.

Kagamu, H., Kitano, S., Yamaguchi, O., Yoshimura, K., Horimoto, K., Kitazawa, M., Fukui, K., Shiono, A., Mouri, A., Nishihara, F., et al. (2019). CD4+ T-cell Immunity in the Peripheral Blood Correlates with Response to Anti-PD-1 Therapy. Cancer Immunol. Res.

Kakimi, K., Nakajima, J., and Wada, H. (2009). Active specific immunotherapy and cell-transfer therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. Lung Cancer Amst. Neth. *65*, 1–8.

Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., et al. (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. Science *355*, 1423–1427.

Kan, G., and Dong, W. (2015). The expression of PD-L1 APE1 and P53 in hepatocellular carcinoma and its relationship to clinical pathology. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. *19*, 3063–3071.

Kansy, B.A., Concha-Benavente, F., Srivastava, R.M., Jie, H.-B., Shayan, G., Lei, Y., Moskovitz, J., Moy, J., Li, J., Brandau, S., et al. (2017). PD-1 Status in CD8+ T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer. Cancer Res. *77*, 6353–6364.

Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Crespo, G., Drozdowskyj, A., Aldeguer, E., Gimenez-Capitan, A., Teixido, C., Molina-Vila, M.A., Viteri, S., De Los Llanos Gil, M., et al. (2018). Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. Ther. Adv. Med. Oncol. *10*, 1758834017749748.

Karasaki, T., Nagayama, K., Kuwano, H., Nitadori, J.-I., Sato, M., Anraku, M., Hosoi, A., Matsushita, H., Morishita, Y., Kashiwabara, K., et al. (2017). An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer. J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer *12*, 791–803.

Karulin, A., Karacsony, K., Zhang, W., Targoni, O., Moldovan, I., Dittrich, M., Sundararaman, S., and Lehmann, P. (2015). ELISPOTs Produced by CD8 and CD4 Cells Follow Log Normal Size Distribution Permitting Objective Counting. Cells *4*, 56–70.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J.R., Adema, G.J., Miki, T., and Rosenberg, S.A. (1994). Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 6458–6462.

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

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. N. Engl. J. Med. *361*, 1838–1847.

Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S.F., Patel, K.P., Werner, M.T., Huang, A.C., Alexander, K.A., Wu, J.E., et al. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. Nature *571*, 211–218.

Kiecker, F., Streitz, M., Ay, B., Cherepnev, G., Volk, H.-D., Volkmer-Engert, R., and Kern, F. (2004). Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides—what kind of peptide for which purpose? Hum. Immunol. *65*, 523–536.

Killela, P.J., Reitman, Z.J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L.A., Friedman, A.H., Friedman, H., Gallia, G.L., Giovanella, B.C., et al. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 6021–6026.

Kim, H.-J., and Cantor, H. (2014). CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. Cancer Immunol. Res. *2*, 91–98.

Kim, H.R., Park, S.-M., Seo, S.-U., Jung, I., Yoon, H.I., Gabrilovich, D.I., Cho, B.C., Seong, S.-Y., Ha, S.-J., and Youn, J.-I. (2019). The Ratio of Peripheral Regulatory T Cells to Lox-1+ Polymorphonuclear Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts the Early Response to Anti-PD-1 Therapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *199*, 243–246.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science *266*, 2011–2015.

Kim, S., François, E., André, T., Samalin, E., Jary, M., El Hajbi, F., Baba-Hamed, N., Pernot, S., Kaminsky, M.-C., Bouché, O., et al. (2018). Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil chemotherapy for metastatic or unresectable locally recurrent anal squamous cell carcinoma (Epitopes-HPV02): a multicentre, single-arm, phase 2 study. Lancet Oncol. *19*, 1094–1106.

Kitano, S., Postow, M.A., Ziegler, C.G.K., Kuk, D., Panageas, K.S., Cortez, C., Rasalan, T., Adamow, M., Yuan, J., Wong, P., et al. (2014). Computational algorithm-driven evaluation of monocytic myeloid-

derived suppressor cell frequency for prediction of clinical outcomes. Cancer Immunol. Res. *2*, 812–821.

Klempner, S.J., Fabrizio, D., Bane, S., Reinhart, M., Peoples, T., Ali, S.M., Sokol, E.S., Frampton, G., Schrock, A.B., Anhorn, R., et al. (2020). Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker for Response to Immune Checkpoint Inhibitors: A Review of Current Evidence. The Oncologist *25*, e147–e159.

Klingelhutz, A.J., Foster, S.A., and McDougall, J.K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature *380*, 79–82.

Knochelmann, H.M., Dwyer, C.J., Bailey, S.R., Amaya, S.M., Elston, D.M., Mazza-McCrann, J.M., and Paulos, C.M. (2018). When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. Cell. Mol. Immunol. *15*, 458–469.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature *450*, 903–907.

Koyama, S., Akbay, E.A., Li, Y.Y., Herter-Sprie, G.S., Buczkowski, K.A., Richards, W.G., Gandhi, L., Redig, A.J., Rodig, S.J., Asahina, H., et al. (2016). Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. Nat. Commun. *7*, 10501.

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

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

Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. J. Exp. Med. *182*, 459–465.

Kusuda, T., Shigemasa, K., Arihiro, K., Fujii, T., Nagai, N., and Ohama, K. (2005). Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. Oncol. Rep. *13*, 1153–1158.

Kutscher, S., Dembek, C.J., Deckert, S., Russo, C., Körber, N., Bogner, J.R., Geisler, F., Umgelter, A., Neuenhahn, M., Albrecht, J., et al. (2013). Overnight resting of PBMC changes functional signatures of antigen specific T- cell responses: impact for immune monitoring within clinical trials. PloS One *8*, e76215.

Kvistborg, P., Philips, D., Kelderman, S., Hageman, L., Ottensmeier, C., Joseph-Pietras, D., Welters, M.J.P., van der Burg, S., Kapiteijn, E., Michielin, O., et al. (2014). Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. Sci. Transl. Med. *6*, 254ra128.

Kwok, W.W., Tan, V., Gillette, L., Littell, C.T., Soltis, M.A., LaFond, R.B., Yang, J., James, E.A., and DeLong, J.H. (2012). Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *188*, 2537–2544.

Kyo, S., and Inoue, M. (2002). Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? Oncogene *21*, 688–697.

Ladoire, S., Arnould, L., Apetoh, L., Coudert, B., Martin, F., Chauffert, B., Fumoleau, P., and Ghiringhelli, F. (2008). Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 2413–2420.

Ladoire, S., Arnould, L., Mignot, G., Apetoh, L., Rébé, C., Martin, F., Fumoleau, P., Coudert, B., and Ghiringhelli, F. (2011a). T-bet expression in intratumoral lymphoid structures after neoadjuvant trastuzumab plus docetaxel for HER2-overexpressing breast carcinoma predicts survival. Br. J. Cancer *105*, 366–371.

Ladoire, S., Mignot, G., Dabakuyo, S., Arnould, L., Apetoh, L., Rébé, C., Coudert, B., Martin, F., Bizollon, M.H., Vanoli, A., et al. (2011b). In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. J. Pathol. *224*, 389–400.

Laheurte, C., Galaine, J., Beziaud, L., Dosset, M., Kerzerho, J., Jacquemard, C., Gaugler, B., Ferrand, C., Dormoy, A., Aubin, F., et al. (2016). Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4(+) Th1 responses against telomerase in cancer patients. Oncoimmunology *5*, e1137416.

Laheurte, C., Dosset, M., Vernerey, D., Boullerot, L., Gaugler, B., Gravelin, E., Kaulek, V., Jacquin, M., Cuche, L., Eberst, G., et al. (2019). Distinct prognostic value of circulating anti-telomerase CD4+ Th1 immunity and exhausted PD-1+/TIM-3+ T cells in lung cancer. Br. J. Cancer *121*, 405–416.

Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Kaech, S.M. (2016). The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. Nat. Rev. Immunol. *16*, 102–111.

Lalani, A.-K.A., Xie, W., Martini, D.J., Steinharter, J.A., Norton, C.K., Krajewski, K.M., Duquette, A., Bossé, D., Bellmunt, J., Van Allen, E.M., et al. (2018). Change in Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in response to immune checkpoint blockade for metastatic renal cell carcinoma. J. Immunother. Cancer *6*, 5.

Lamoreaux, L., Roederer, M., and Koup, R. (2006). Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. Nat. Protoc. *1*, 1507–1516.

Lantuéjoul, S., Salon, C., Soria, J.-C., and Brambilla, E. (2007). Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. Int. J. Cancer *120*, 1835–1841.

Larsen, M., Sauce, D., Arnaud, L., Fastenackels, S., Appay, V., and Gorochov, G. (2012). Evaluating cellular polyfunctionality with a novel polyfunctionality index. PloS One *7*, e42403.

Laugel, B., van den Berg, H.A., Gostick, E., Cole, D.K., Wooldridge, L., Boulter, J., Milicic, A., Price, D.A., and Sewell, A.K. (2007). Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties. J. Biol. Chem. *282*, 23799–23810.

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N. Engl. J. Med. *372*, 2509–2520.

Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. Science *271*, 1734–1736.

Leão, R., Lee, D., Figueiredo, A., Hermanns, T., Wild, P., Komosa, M., Lau, I., Mistry, M., Nunes, N.M., Price, A.J., et al. (2019). Combined genetic and epigenetic alterations of the TERT promoter affect clinical and biological behavior of bladder cancer. Int. J. Cancer *144*, 1676–1684.

Lee, J.H., Long, G.V., Boyd, S., Lo, S., Menzies, A.M., Tembe, V., Guminski, A., Jakrot, V., Scolyer, R.A., Mann, G.J., et al. (2017). Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *28*, 1130–1136.

Lemaître, F., Viguier, M., Cho, M.-S., Fourneau, J.-M., Maillère, B., Kourilsky, P., Van Endert, P.M., and Ferradini, L. (2004). Detection of low-frequency human antigen-specific CD4(+) T cells using MHC class II multimer bead sorting and immunoscope analysis. Eur. J. Immunol. *34*, 2941–2949.

Lesterhuis, W.J., Bosco, A., Millward, M.J., Small, M., Nowak, A.K., and Lake, R.A. (2017). Dynamic versus static biomarkers in cancer immune checkpoint blockade: unravelling complexity. Nat. Rev. Drug Discov. *16*, 264–272.

Letsch, A., and Scheibenbogen, C. (2003). Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. Methods *31*, 143–149.

Li, Y., and Tergaonkar, V. (2014). Noncanonical Functions of Telomerase: Implications in Telomerase-Targeted Cancer Therapies. Cancer Res. *74*, 1639–1644.

Li, H., Wu, K., Tao, K., Chen, L., Zheng, Q., Lu, X., Liu, J., Shi, L., Liu, C., Wang, G., et al. (2012). Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. Hepatol. Baltim. Md *56*, 1342–1351.

Liakou, C.I., Kamat, A., Tang, D.N., Chen, H., Sun, J., Troncoso, P., Logothetis, C., and Sharma, P. (2008). CTLA-4 blockade increases IFNgamma-producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 14987–14992.

Lim, S.H., Zhang, Y., and Zhang, J. (2012). Cancer-testis antigens: the current status on antigen regulation and potential clinical use. Am. J. Blood Res. *2*, 29–35.

Limagne, E., Euvrard, R., Thibaudin, M., Rébé, C., Derangère, V., Chevriaux, A., Boidot, R., Végran, F., Bonnefoy, N., Vincent, J., et al. (2016). Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen. Cancer Res. *76*, 5241–5252.

Limagne, E., Thibaudin, M., Nuttin, L., Spill, A., Derangère, V., Fumet, J.-D., Amellal, N., Peranzoni, E., Cattan, V., and Ghiringhelli, F. (2019). Trifluridine/Tipiracil plus Oxaliplatin Improves PD-1 Blockade in Colorectal Cancer by Inducing Immunogenic Cell Death and Depleting Macrophages. Cancer Immunol. Res. *7*, 1958–1969.

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

Lipson, E.J., Velculescu, V.E., Pritchard, T.S., Sausen, M., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., and Diaz, L.A. (2014). Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. J. Immunother. Cancer *2*, 42.

Lissina, A., Ladell, K., Skowera, A., Clement, M., Edwards, E., Seggewiss, R., van den Berg, H.A., Gostick, E., Gallagher, K., Jones, E., et al. (2009). Protein kinase inhibitors substantially improve the physical detection of T-cells with peptide-MHC tetramers. J. Immunol. Methods *340*, 11–24.

Listerman, I., Sun, J., Gazzaniga, F.S., Lukas, J.L., and Blackburn, E.H. (2013). The Major Reverse Transcriptase-Incompetent Splice Variant of the Human Telomerase Protein Inhibits Telomerase Activity but Protects from Apoptosis. Cancer Res. *73*, 2817–2828.

Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D.L., and Vignali, D.A. (2000). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. Immunity *13*, 665–675.

Liu, N., Guo, X.-H., Liu, J.-P., and Cong, Y.-S. (2020). Role of telomerase in the tumour microenvironment. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *47*, 357–364.

Liu, X., Dakic, A., Zhang, Y., Dai, Y., Chen, R., and Schlegel, R. (2009). HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 18780–18785.

Liu, X., Li, M., Wang, X., Dang, Z., Jiang, Y., Wang, X., Kong, Y., and Yang, Z. (2019). PD-1+ TIGIT+ CD8+ T cells are associated with pathogenesis and progression of patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Cancer Immunol. Immunother. CII *68*, 2041–2054.

Liu, Z., Li, Q., Li, K., Chen, L., Li, W., Hou, M., Liu, T., Yang, J., Lindvall, C., Björkholm, M., et al. (2013). Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. Oncogene *32*, 4203–4213.

Liu, Z., Poiret, T., Persson, O., Meng, Q., Rane, L., Bartek, J., Karbach, J., Altmannsberger, H.-M., Illies, C., Luo, X., et al. (2018). NY-ESO-1- and survivin-specific T-cell responses in the peripheral blood from patients with glioma. Cancer Immunol. Immunother. *67*, 237–246.

Locke, F.L., Menges, M., Veerapathran, A., Coppola, D., Gabrilovich, D., and Anasetti, C. (2015). Survivin-specific CD4+ T cells are decreased in patients with survivin-positive myeloma. J. Immunother. Cancer *3*, 20.

Lötsch, D., Ghanim, B., Laaber, M., Wurm, G., Weis, S., Lenz, S., Webersinke, G., Pichler, J., Berger, W., and Spiegl-Kreinecker, S. (2013). Prognostic significance of telomerase-associated parameters in glioblastoma: effect of patient age. Neuro-Oncol. *15*, 423–432.

Low, K.C., and Tergaonkar, V. (2013). Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. Trends Biochem. Sci. *38*, 426–434.

Loyon, R., Jary, M., Salomé, B., Gomez-Cadena, A., Galaine, J., Kroemer, M., Romero, P., Trabanelli, S., Adotévi, O., Borg, C., et al. (2019). Peripheral Innate Lymphoid Cells Are Increased in First Line Metastatic Colorectal Carcinoma Patients: A Negative Correlation With Th1 Immune Responses. Front. Immunol. *10*, 2121.

Łuksza, M., Riaz, N., Makarov, V., Balachandran, V.P., Hellmann, M.D., Solovyov, A., Rizvi, N.A., Merghoub, T., Levine, A.J., Chan, T.A., et al. (2017). A neoantigen fitness model predicts tumour response to checkpoint blockade immunotherapy. Nature *551*, 517–520.

Lyford-Pike, S., Peng, S., Young, G.D., Taube, J.M., Westra, W.H., Akpeng, B., Bruno, T.C., Richmon, J.D., Wang, H., Bishop, J.A., et al. (2013). Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. *73*, 1733–1741.

Mackall, C.L., Fry, T.J., and Gress, R.E. (2011). Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. Nat. Rev. Immunol. *11*, 330–342.

Maecker, H.T., Frey, T., Nomura, L.E., and Trotter, J. (2004). Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. *62*, 169–173.

Maecker, H.T., McCoy, J.P., FOCIS Human Immunophenotyping Consortium, Amos, M., Elliott, J., Gaigalas, A., Wang, L., Aranda, R., Banchereau, J., Boshoff, C., et al. (2010). A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials. Nat. Immunol. *11*, 975–978.

Malaspina, T.S. de S., Gasparoto, T.H., Costa, M.R.S.N., de Melo, E.F., Ikoma, M.R.V., Damante, J.H., Cavassani, K.A., Garlet, G.P., da Silva, J.S., and Campanelli, A.P. (2011). Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. Cancer Immunol. Immunother. CII *60*, 965–974.

Mandruzzato, S., Brandau, S., Britten, C.M., Bronte, V., Damuzzo, V., Gouttefangeas, C., Maurer, D., Ottensmeier, C., van der Burg, S.H., Welters, M.J.P., et al. (2016). Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. Cancer Immunol. Immunother. CII *65*, 161–169.

Manson, G., Norwood, J., Marabelle, A., Kohrt, H., and Houot, R. (2016). Biomarkers associated with checkpoint inhibitors. Ann. Oncol. *27*, 1199–1206.

Marchetti, A., Pellegrini, C., Buttitta, F., Falleni, M., Romagnoli, S., Felicioni, L., Barassi, F., Salvatore, S., Chella, A., Angeletti, C.A., et al. (2002). Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *82*, 729–736.

Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Yuan, J., Postow, M.A., Wong, P., Capone, M., Madonna, G., Khammari, A., Schilling, B., Sucker, A., et al. (2016). Increases in Absolute Lymphocytes and Circulating CD4+ and CD8+ T Cells Are Associated with Positive Clinical Outcome of Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *22*, 4848–4858.

Martínez, P., and Blasco, M.A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. Nat. Rev. Cancer *11*, 161–176.

Martinuzzi, E., Scotto, M., Énée, E., Brezar, V., Ribeil, J.-A., van Endert, P., and Mallone, R. (2008). Serum-free culture medium and IL-7 costimulation increase the sensitivity of ELISpot detection. J. Immunol. Methods *333*, 61–70.

Martinuzzi, E., Afonso, G., Gagnerault, M.-C., Naselli, G., Mittag, D., Combadière, B., Boitard, C., Chaput, N., Zitvogel, L., Harrison, L.C., et al. (2011). acDCs enhance human antigen–specific T-cell responses. Blood *118*, 2128–2137.

Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsuwat, T., Zha, Y., Alegre, M.-L., Luke, J.J., and Gajewski, T.F. (2018). The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. Science *359*, 104–108.

Matsuzaki, J., Tsuji, T., Luescher, I.F., Shiku, H., Mineno, J., Okamoto, S., Old, L.J., Shrikant, P., Gnjatic, S., and Odunsi, K. (2015). Direct tumor recognition by a human CD4(+) T-cell subset potently mediates tumor growth inhibition and orchestrates anti-tumor immune responses. Sci. Rep. *5*, 14896.

McGranahan, N., and Swanton, C. (2017). Cancer Evolution Constrained by the Immune Microenvironment. Cell *170*, 825–827.

McNeil, L.K., Price, L., Britten, C.M., Jaimes, M., Maecker, H., Odunsi, K., Matsuzaki, J., Staats, J.S., Thorpe, J., Yuan, J., et al. (2013). A harmonized approach to intracellular cytokine staining gating: Results from an international multiconsortia proficiency panel conducted by the Cancer Immunotherapy Consortium (CIC/CRI): ICS Gating Proficiency Panel. Cytometry A *83A*, 728–738.

Meier, T., Eulenbruch, H.-P., Wrighton-Smith, P., Enders, G., and Regnath, T. (2005). Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. *24*, 529–536.

Melton, C., Reuter, J.A., Spacek, D.V., and Snyder, M. (2015). Recurrent somatic mutations in regulatory regions of human cancer genomes. Nat. Genet. *47*, 710–716.

Merker, J.D., Oxnard, G.R., Compton, C., Diehn, M., Hurley, P., Lazar, A.J., Lindeman, N., Lockwood, C.M., Rai, A.J., Schilsky, R.L., et al. (2018). Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. J. Clin. Oncol. *36*, 1631–1641.

Meyer, C., Cagnon, L., Costa-Nunes, C.M., Baumgaertner, P., Montandon, N., Leyvraz, L., Michielin, O., Romano, E., and Speiser, D.E. (2014). Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. Cancer Immunol. Immunother. CII *63*, 247–257.

Min, J., and Shay, J.W. (2016). TERT Promoter Mutations Enhance Telomerase Activation by Long-Range Chromatin Interactions. Cancer Discov. *6*, 1212–1214.

Mino-Kenudson, M. (2016). Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? Cancer Biol. Med. *13*, 157–170.

Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. Curr. Opin. Immunol. *27*, 16–25.

Mizukoshi, E., and Kaneko, S. (2019). Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy. Int. J. Mol. Sci. *20*, 1823.

Mocellin, S., Verdi, D., Pooley, K.A., Landi, M.T., Egan, K.M., Baird, D.M., Prescott, J., De Vivo, I., and Nitti, D. (2012). Telomerase reverse transcriptase locus polymorphisms and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. J. Natl. Cancer Inst. *104*, 840–854.

Monney, L., Sabatos, C.A., Gaglia, J.L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E.A., Coyle, A.J., Sobel, R.A., et al. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. Nature *415*, 536–541.

Monsurrò, V., Nagorsen, D., Wang, E., Provenzano, M., Dudley, M.E., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M. (2002). Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8(+) T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *168*, 5933–5942.

Montes, M., Rufer, N., Appay, V., Reynard, S., Pittet, M.J., Speiser, D.E., Guillaume, P., Cerottini, J.-C., Romero, P., and Leyvraz, S. (2005). Optimum in vitro expansion of human antigen-specific CD8 T cells for adoptive transfer therapy. Clin. Exp. Immunol. *142*, 292–302.

Moodie, Z., Price, L., Gouttefangeas, C., Mander, A., Janetzki, S., Löwer, M., Welters, M.J.P., Ottensmeier, C., van der Burg, S.H., and Britten, C.M. (2010). Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. Cancer Immunol. Immunother. CII *59*, 1489–1501.

Mori, H., Kubo, M., Kai, M., Yamada, M., Kurata, K., Kawaji, H., Kaneshiro, K., Osako, T., Nishimura, R., Arima, N., et al. (2019). T-bet+ lymphocytes infiltration as an independent better prognostic indicator for triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *176*, 569–577.

Moschetta, M., Uccello, M., Kasenda, B., Mak, G., McClelland, A., Boussios, S., Forster, M., and Arkenau, H.-T. (2017). Dynamics of Neutrophils-to-Lymphocyte Ratio Predict Outcomes of PD-1/PD-L1 Blockade. BioMed Res. Int. *2017*, 1506824.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. *7*, 145–173.

Mukherjee, S., Firpo, E.J., Wang, Y., and Roberts, J.M. (2011). Separation of telomerase functions by reverse genetics. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, E1363-1371.

Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S., and Lewis, C.E. (2007). Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *178*, 7405–7411.

Murtaza, M., Dawson, S.-J., Pogrebniak, K., Rueda, O.M., Provenzano, E., Grant, J., Chin, S.-F., Tsui, D.W.Y., Marass, F., Gale, D., et al. (2015). Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. Nat. Commun. *6*, 8760.

Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Marincola, F.M., Letsch, A., and Keilholz, U. (2003). Natural T cell immunity against cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *9*, 4296–4303.

Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Thiel, E., and Keilholz, U. (2004). Immunological monitoring of cancer vaccine therapy. Expert Opin. Biol. Ther. *4*, 1677–1684.

Nakamura, Y., Kitano, S., Takahashi, A., Tsutsumida, A., Namikawa, K., Tanese, K., Abe, T., Funakoshi, T., Yamamoto, N., Amagai, M., et al. (2016). Nivolumab for advanced melanoma: pretreatment prognostic factors and early outcome markers during therapy. Oncotarget *7*, 77404–77415.

Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C., and Iwasaki, A. (2009). CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. Nature *462*, 510–513.

Navarrete, M.A., Bertinetti-Lapatki, C., Michelfelder, I., and Veelken, H. (2013). Usage of standardized antigen-presenting cells improves ELISpot performance for complex protein antigens. J. Immunol. Methods *391*, 146–153.

Neubauer, J.C., Sébastien, I., Germann, A., Müller, S.C., Meyerhans, A., von Briesen, H., and Zimmermann, H. (2017). Towards standardized automated immunomonitoring: an automated ELISpot assay for safe and parallelized functionality analysis of immune cells. Cytotechnology *69*, 57–73.

Neubert, N.J., Schmittnaegel, M., Bordry, N., Nassiri, S., Wald, N., Martignier, C., Tillé, L., Homicsko, K., Damsky, W., Maby-El Hajjami, H., et al. (2018). T cell-induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade. Sci. Transl. Med. *10*.

Newell, E.W., Klein, L.O., Yu, W., and Davis, M.M. (2009). Simultaneous detection of many T-cell specificities using combinatorial tetramer staining. Nat. Methods *6*, 497–499.

Newell, E.W., Sigal, N., Bendall, S.C., Nolan, G.P., and Davis, M.M. (2012). Cytometry by Time-of-Flight Shows Combinatorial Cytokine Expression and Virus-Specific Cell Niches within a Continuum of CD8+ T Cell Phenotypes. Immunity *36*, 142–152.

Ng Tang, D., Shen, Y., Sun, J., Wen, S., Wolchok, J.D., Yuan, J., Allison, J.P., and Sharma, P. (2013). Increased frequency of ICOS+ CD4 T cells as a pharmacodynamic biomarker for anti-CTLA-4 therapy. Cancer Immunol. Res. *1*, 229–234.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity *11*, 141–151.

Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., et al. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science *291*, 319–322.

Nizard, M., Roussel, H., Diniz, M.O., Karaki, S., Tran, T., Voron, T., Dransart, E., Sandoval, F., Riquet, M., Rance, B., et al. (2017). Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. Nat. Commun. *8*, 15221.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. Immunity *29*, 138–149.

Ochi, A., Nguyen, A.H., Bedrosian, A.S., Mushlin, H.M., Zarbakhsh, S., Barilla, R., Zambirinis, C.P., Fallon, N.C., Rehman, A., Pylayeva-Gupta, Y., et al. (2012). MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. J. Exp. Med. *209*, 1671–1687.

Oelke, M., Maus, M.V., Didiano, D., June, C.H., Mackensen, A., and Schneck, J.P. (2003). Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. Nat. Med. *9*, 619–624.

van Oijen, M. (2004). On the Role of Melanoma-Specific CD8+ T-Cell Immunity in Disease Progression of Advanced-Stage Melanoma Patients. Clin. Cancer Res. *10*, 4754–4760.

O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science *327*, 1098–1102.

Ostrand-Rosenberg, S., and Fenselau, C. (2018). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *200*, 422–431.

Ott, P.A., Berner, B.R., Herzog, B.A., Guerkov, R., Yonkers, N.L., Durinovic-Bello, I., Tary-Lehmann, M., Lehmann, P.V., and Anthony, D.D. (2004). CD28 costimulation enhances the sensitivity of the ELISPOT assay for detection of antigen-specific memory effector CD4 and CD8 cell populations in human diseases. J. Immunol. Methods *285*, 223–235.

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. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *27*, 5944–5951.

Pagès, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.-S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T.T., Berger, M.D., et al. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. Lancet Lond. Engl. *391*, 2128–2139.

Pallmer, K., and Oxenius, A. (2016). Recognition and Regulation of T Cells by NK Cells. Front. Immunol. *7*.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer *12*, 252–264.

Park, J.-I., Venteicher, A.S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., et al. (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. Nature *460*, 66–72.

Park, N.H., Guo, W., Kim, H.R., Kang, M.K., and Park, N.H. (2001). c-Myc and Sp1/3 are required for transactivation of hamster telomerase catalytic subunit gene promoter. Int. J. Oncol. *19*, 755–761.

Park, Y.-J., Kuen, D.-S., and Chung, Y. (2018). Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: from response prediction to overcoming resistance. Exp. Mol. Med. *50*, 109.

Parkhurst, M.R., Yang, J.C., Langan, R.C., Dudley, M.E., Nathan, D.-A.N., Feldman, S.A., Davis, J.L., Morgan, R.A., Merino, M.J., Sherry, R.M., et al. (2011). T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *19*, 620–626.

Parmiani, G., Russo, V., Marrari, A., Cutolo, G., Casati, C., Pilla, L., Maccalli, C., Rivoltini, L., and Castelli, C. (2007). Universal and stemness-related tumor antigens: potential use in cancer immunotherapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *13*, 5675–5679.

Pastore, G., Carraro, M., Pettini, E., Nolfi, E., Medaglini, D., and Ciabattini, A. (2019). Optimized Protocol for the Detection of Multifunctional Epitope-Specific CD4+ T Cells Combining MHC-II Tetramer and Intracellular Cytokine Staining Technologies. Front. Immunol. *10*, 2304.

Patel, S.A., and Minn, A.J. (2018). Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies. Immunity *48*, 417–433.

Pauken, K.E., and Wherry, E.J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. Trends Immunol. *36*, 265–276.

Paulsen, E.-E., Kilvaer, T.K., Rakaee, M., Richardsen, E., Hald, S.M., Andersen, S., Busund, L.-T., Bremnes, R.M., and Donnem, T. (2017). CTLA-4 expression in the non-small cell lung cancer patient tumor microenvironment: diverging prognostic impact in primary tumors and lymph node metastases. Cancer Immunol. Immunother. CII *66*, 1449–1461.

Peifer, M., Hertwig, F., Roels, F., Dreidax, D., Gartlgruber, M., Menon, R., Krämer, A., Roncaioli, J.L., Sand, F., Heuckmann, J.M., et al. (2015). Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. Nature *526*, 700–704.

Peng, S., Trimble, C., Wu, L., Pardoll, D., Roden, R., Hung, C.-F., and Wu, T.-C. (2007). HLA-DQB1*02-restricted HPV-16 E7 peptide-specific CD4+ T-cell immune responses correlate with regression of HPV-16-associated high-grade squamous intraepithelial lesions. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *13*, 2479–2487.

Pere, H., Tanchot, C., Bayry, J., Terme, M., Taieb, J., Badoual, C., Adotevi, O., Merillon, N., Marcheteau, E., Quillien, V.R., et al. (2012). Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer. Oncoimmunology *1*, 326–333.

Petitprez, F., de Reyniès, A., Keung, E.Z., Chen, T.W.-W., Sun, C.-M., Calderaro, J., Jeng, Y.-M., Hsiao, L.-P., Lacroix, L., Bougoüin, A., et al. (2020). B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. Nature *577*, 556–560.

Picard, E., Godet, Y., Laheurte, C., Dosset, M., Galaine, J., Beziaud, L., Loyon, R., Boullerot, L., Lauret Marie Joseph, E., Spehner, L., et al. (2019). Circulating NKp46+ Natural Killer cells have a potential regulatory property and predict distinct survival in Non-Small Cell Lung Cancer. Oncoimmunology *8*, e1527498.

Pitt, J.M., Vétizou, M., Daillère, R., Roberti, M.P., Yamazaki, T., Routy, B., Lepage, P., Boneca, I.G., Chamaillard, M., Kroemer, G., et al. (2016). Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. Immunity *44*, 1255–1269.

Poggio, M., Hu, T., Pai, C.-C., Chu, B., Belair, C.D., Chang, A., Montabana, E., Lang, U.E., Fu, Q., Fong, L., et al. (2019). Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. Cell *177*, 414-427.e13.

Powles, T., Eder, J.P., Fine, G.D., Braiteh, F.S., Loriot, Y., Cruz, C., Bellmunt, J., Burris, H.A., Petrylak, D.P., Teng, S., et al. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. Nature *515*, 558–562.

Prelaj, A., Tay, R., Ferrara, R., Chaput, N., Besse, B., and Califano, R. (2019). Predictive biomarkers of response for immune checkpoint inhibitors in non–small-cell lung cancer. Eur. J. Cancer *106*, 144–159.

Prilliman, K.R., Lemmens, E.E., Palioungas, G., Wolfe, T.G., Allison, J.P., Sharpe, A.H., and Schoenberger, S.P. (2002). Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *169*, 4094–4097.

Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H.S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A.M., Khoury, S.J., Fuhlbrigge, R.C., Kuchroo, V.K., et al. (2012). Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. Nat. Med. *18*, 1248–1253.

Qin, T., Zeng, Y., Qin, G., Xu, F., Lu, J., Fang, W., Xue, C., Zhan, J., Zhang, X., Zheng, Q., et al. (2015). High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. Oncotarget *6*, 33972–33981.

Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. Science *332*, 600–603.

Ready, N., Hellmann, M.D., Awad, M.M., Otterson, G.A., Gutierrez, M., Gainor, J.F., Borghaei, H., Jolivet, J., Horn, L., Mates, M., et al. (2019). First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *37*, 992–1000.

Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A.G., Hui, R., Csőszi, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., et al. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N. Engl. J. Med. *375*, 1823–1833.

Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Riquet, M., Crozet, L., Ouakrim, H., Goc, J., Cazes, A., et al. (2013). Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 4079–4091.

Rhee, I. (2016). Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. Arch. Pharm. Res. *39*, 1588–1596.

Riaz, N., Havel, J.J., Kendall, S.M., Makarov, V., Walsh, L.A., Desrichard, A., Weinhold, N., and Chan, T.A. (2016). Recurrent SERPINB3 and SERPINB4 mutations in patients who respond to anti-CTLA4 immunotherapy. Nat. Genet. *48*, 1327–1329.

Ribas, A. (2015). Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. Cancer Discov. *5*, 915–919.

Ribas, A., and Wolchok, J.D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. Science *359*, 1350–1355.

Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. Nature *393*, 474–478.

Rius, C., Attaf, M., Tungatt, K., Bianchi, V., Legut, M., Bovay, A., Donia, M., Straten, P. thor, Peakman, M., Svane, I.M., et al. (2018). Peptide–MHC Class I Tetramers Can Fail To Detect Relevant Functional T Cell Clonotypes and Underestimate Antigen-Reactive T Cell Populations. J. Immunol. *200*, 2263–2279.

Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science *348*, 124–128.

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.

Robert, L., Tsoi, J., Wang, X., Emerson, R., Homet, B., Chodon, T., Mok, S., Huang, R.R., Cochran, A.J., Comin-Anduix, B., et al. (2014). CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *20*, 2424–2432.

Rodenko, B., Toebes, M., Hadrup, S.R., van Esch, W.J.E., Molenaar, A.M., Schumacher, T.N.M., and Ovaa, H. (2006). Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. Nat. Protoc. *1*, 1120–1132.

Roederer, M., Nozzi, J.L., and Nason, M.C. (2011). SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. *79*, 167–174.

Romaniuk, A., Paszel-Jaworska, A., Totoń, E., Lisiak, N., Hołysz, H., Królak, A., Grodecka-Gazdecka, S., and Rubiś, B. (2019). The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. Mol. Biol. Rep. *46*, 1401–1411.

Rosen, H.R., Miner, C., Sasaki, A.W., Lewinsohn, D.M., Conrad, A.J., Bakke, A., Bouwer, H.G.A., and Hinrichs, D.J. (2002). Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. Hepatol. Baltim. Md *35*, 190–198.

Rosenbaum, M.W., Bledsoe, J.R., Morales-Oyarvide, V., Huynh, T.G., and Mino-Kenudson, M. (2016). PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc *29*, 1104–1112.

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.

Ruffini, E., Asioli, S., Filosso, P.L., Lyberis, P., Bruna, M.C., Macrì, L., Daniele, L., and Oliaro, A. (2009). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in lung neoplasms. Ann. Thorac. Surg. *87*, 365–371; discussion 371-372.

Sabatino, J.J., Huang, J., Zhu, C., and Evavold, B.D. (2011). High prevalence of low affinity peptide-MHC II tetramer-negative effectors during polyclonal CD4+ T cell responses. J. Exp. Med. *208*, 81–90.

Sacdalan, D.B., Lucero, J.A., and Sacdalan, D.L. (2018). Prognostic utility of baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients receiving immune checkpoint inhibitors: a review and meta-analysis. OncoTargets Ther. *11*, 955–965.

Safi, S., Yamauchi, Y., Rathinasamy, A., Stamova, S., Eichhorn, M., Warth, A., Rauch, G., Dienemann, H., Hoffmann, H., and Beckhove, P. (2017). Functional T cells targeting tumor-associated antigens are predictive for recurrence-free survival of patients with radically operated non-small cell lung cancer. OncoImmunology *6*, e1360458.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (2011). Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. 1995. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 3808–3821.

Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. J. Exp. Med. *207*, 2187–2194.

Sakuishi, K., Ngiow, S.F., Sullivan, J.M., Teng, M.W.L., Kuchroo, V.K., Smyth, M.J., and Anderson, A.C. (2013). TIM3+FOXP3+ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. Oncoimmunology *2*, e23849.

Saletti, G., Çuburu, N., Yang, J.S., Dey, A., and Czerkinsky, C. (2013). Enzyme-linked immunospot assays for direct ex vivo measurement of vaccine-induced human humoral immune responses in blood. Nat. Protoc. *8*, 1073–1087.

Salmaninejad, A., Zamani, M.R., Pourvahedi, M., Golchehre, Z., Hosseini Bereshneh, A., and Rezaei, N. (2016). Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. Immunol. Invest. *45*, 619–640.

Sander, B., Andersson, J., and Andersson, U. (1991). Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. Immunol. Rev. *119*, 65–93.

Sanmamed, M.F., Perez-Gracia, J.L., Schalper, K.A., Fusco, J.P., Gonzalez, A., Rodriguez-Ruiz, M.E., Oñate, C., Perez, G., Alfaro, C., Martín-Algarra, S., et al. (2017). Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *28*, 1988–1995.

Santiago-Walker, A., Gagnon, R., Mazumdar, J., Casey, M., Long, G.V., Schadendorf, D., Flaherty, K., Kefford, R., Hauschild, A., Hwu, P., et al. (2016). Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *22*, 567–574.

Santos, R., Buying, A., Sabri, N., Yu, J., Gringeri, A., Bender, J., Janetzki, S., Pinilla, C., and Judkowski, V.A. (2014). Improvement of IFNg ELISPOT Performance Following Overnight Resting of Frozen PBMC Samples Confirmed Through Rigorous Statistical Analysis. Cells *4*, 1–18.

Saraswati, A.P., Relitti, N., Brindisi, M., Gemma, S., Zisterer, D., Butini, S., and Campiani, G. (2019). Raising the bar in anticancer therapy: recent advances in, and perspectives on, telomerase inhibitors. Drug Discov. Today *24*, 1370–1388.

Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S., and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. J. Exp. Med. *205*, 625–640.

Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., and Fridman, W.H. (2019). Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer *19*, 307–325.

Schmidt, J., Dojcinovic, D., Guillaume, P., and Luescher, I. (2013). Analysis, Isolation, and Activation of Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells by Soluble MHC-Peptide Complexes. Front. Immunol. *4*.

Schmitt, E., and Bopp, T. (2012). Amazing IL-9: revealing a new function for an “old” cytokine. J. Clin. Invest. *122*, 3857–3859.

Schmittel, A., Keilholz, U., and Scheibenbogen, C. (1997). Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood. J. Immunol. Methods *210*, 167–174.

Schnell, A., Bod, L., Madi, A., and Kuchroo, V.K. (2020). The yin and yang of co-inhibitory receptors: toward anti-tumor immunity without autoimmunity. Cell Res.

Scholz, A., Lang, V., Henschler, R., Czabanka, M., Vajkoczy, P., Chavakis, E., Drynski, J., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Dumont, D.J., et al. (2011). Angiopoietin-2 promotes myeloid cell infiltration in a β_2-integrin-dependent manner. Blood *118*, 5050–5059.

Schreck, S., Friebel, D., Buettner, M., Distel, L., Grabenbauer, G., Young, L.S., and Niedobitek, G. (2009). Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. Hematol. Oncol. *27*, 31–39.

Schreiber, 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.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. Science *348*, 69–74.

Sconocchia, G., Eppenberger-Castori, S., Zlobec, I., Karamitopoulou, E., Arriga, R., Coppola, A., Caratelli, S., Spagnoli, G.C., Lauro, D., Lugli, A., et al. (2014). HLA class II antigen expression in colorectal carcinoma tumors as a favorable prognostic marker. Neoplasia N. Y. N *16*, 31–42.

Scott, A.C., Dündar, F., Zumbo, P., Chandran, S.S., Klebanoff, C.A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., et al. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. Nature *571*, 270–274.

Scurr, M.J., Brown, C.M., Costa Bento, D.F., Betts, G.J., Rees, B.I., Hills, R.K., Gallimore, A., and Godkin, A. (2015). Assessing the prognostic value of preoperative carcinoembryonic antigen-specific T-cell responses in colorectal cancer. J. Natl. Cancer Inst. *107*.

Sedgwick, J.D., and Holt, P.G. (1983). A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. J. Immunol. Methods *57*, 301–309.

Seresini, S., Origoni, M., Lillo, F., Caputo, L., Paganoni, A.M., Vantini, S., Longhi, R., Taccagni, G., Ferrari, A., Doglioni, C., et al. (2007). IFN-gamma produced by human papilloma virus-18 E6-specific CD4+ T cells predicts the clinical outcome after surgery in patients with high-grade cervical lesions. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 7176–7183.

Shain, A.H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., et al. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. N. Engl. J. Med. *373*, 1926–1936.

Shang, B., Liu, Y., Jiang, S., and Liu, Y. (2015). Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. Sci. Rep. *5*, 15179.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature *410*, 1107–1111.

Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. Cell *161*, 205–214.

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Cell *168*, 707–723.

Shay, J.W. (2016). Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. Cancer Discov. *6*, 584–593.

Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *33*, 787–791.

Sheikh, N.A., Petrylak, D., Kantoff, P.W., Dela Rosa, C., Stewart, F.P., Kuan, L.-Y., Whitmore, J.B., Trager, J.B., Poehlein, C.H., Frohlich, M.W., et al. (2013). Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: an analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer. Cancer Immunol. Immunother. CII *62*, 137–147.

Shen, T., Zhou, L., Shen, H., Shi, C., Jia, S., Ding, G.P., and Cao, L. (2017). Prognostic value of programmed cell death protein 1 expression on CD8+ T lymphocytes in pancreatic cancer. Sci. Rep. *7*, 7848.

Shimato, S., Maier, L.M., Maier, R., Bruce, J.N., Anderson, R.C., and Anderson, D.E. (2012). Profound tumor-specific Th2 bias in patients with malignant glioma. BMC Cancer *12*, 561.

Shimauchi, T., Kabashima, K., Nakashima, D., Sugita, K., Yamada, Y., Hino, R., and Tokura, Y. (2007). Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. Int. J. Cancer *121*, 2585–2590.

Shin, D.S., Zaretsky, J.M., Escuin-Ordinas, H., Garcia-Diaz, A., Hu-Lieskovan, S., Kalbasi, A., Grasso, C.S., Hugo, W., Sandoval, S., Torrejon, D.Y., et al. (2017). Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. Cancer Discov. *7*, 188–201.

Shin, S.-J., Jeon, Y.K., Kim, P.-J., Cho, Y.M., Koh, J., Chung, D.H., and Go, H. (2016). Clinicopathologic Analysis of PD-L1 and PD-L2 Expression in Renal Cell Carcinoma: Association with Oncogenic Proteins Status. Ann. Surg. Oncol. *23*, 694–702.

Simpson, A.J.G., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.-T., and Old, L.J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. Nat. Rev. Cancer *5*, 615–625.

Sims, S., Willberg, C., and Klenerman, P. (2010). MHC–peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells. Expert Rev. Vaccines *9*, 765–774.

Skoulidis, F., Byers, L.A., Diao, L., Papadimitrakopoulou, V.A., Tong, P., Izzo, J., Behrens, C., Kadara, H., Parra, E.R., Canales, J.R., et al. (2015). Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. Cancer Discov. *5*, 860–877.

Skoulidis, F., Goldberg, M.E., Greenawalt, D.M., Hellmann, M.D., Awad, M.M., Gainor, J.F., Schrock, A.B., Hartmaier, R.J., Trabucco, S.E., Gay, L., et al. (2018). STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. Cancer Discov. *8*, 822–835.

Smith, S.G., Smits, K., Joosten, S.A., van Meijgaarden, K.E., Satti, I., Fletcher, H.A., Caccamo, N., Dieli, F., Mascart, F., McShane, H., et al. (2015). Intracellular Cytokine Staining and Flow Cytometry: Considerations for Application in Clinical Trials of Novel Tuberculosis Vaccines. PLOS ONE *10*, e0138042.

Snyder, A., Morrissey, M.P., and Hellmann, M.D. (2019). Use of Circulating Tumor DNA for Cancer Immunotherapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *25*, 6909–6915.

Solito, S., Marigo, I., Pinton, L., Damuzzo, V., Mandruzzato, S., and Bronte, V. (2014). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1319*, 47–65.

Spitzer, M.H., Carmi, Y., Reticker-Flynn, N.E., Kwek, S.S., Madhireddy, D., Martins, M.M., Gherardini, P.F., Prestwood, T.R., Chabon, J., Bendall, S.C., et al. (2017). Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. Cell *168*, 487-502.e15.

Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T.F. (2015). Melanoma-intrinsic β-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. Nature *523*, 231–235.

Stern, J.L., Theodorescu, D., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., and Cech, T.R. (2015). Mutation of the TERT promoter, switch to active chromatin, and monoallelic TERT expression in multiple cancers. Genes Dev. *29*, 2219–2224.

Streeck, H., Frahm, N., and Walker, B.D. (2009). The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. Nat. Protoc. *4*, 461–469.

Stroncek, D.F., Butterfield, L.H., Cannarile, M.A., Dhodapkar, M.V., Greten, T.F., Grivel, J.C., Kaufman, D.R., Kong, H.H., Korangy, F., Lee, P.P., et al. (2017). Systematic evaluation of immune regulation and modulation. J. Immunother. Cancer *5*, 21.

Sucker, A., Zhao, F., Pieper, N., Heeke, C., Maltaner, R., Stadtler, N., Real, B., Bielefeld, N., Howe, S., Weide, B., et al. (2017). Acquired IFNγ resistance impairs anti-tumor immunity and gives rise to T-cell-resistant melanoma lesions. Nat. Commun. *8*, 15440.

Suh, K.J., Kim, S.H., Kim, Y.J., Kim, M., Keam, B., Kim, T.M., Kim, D.-W., Heo, D.S., and Lee, J.S. (2018). Post-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio at week 6 is prognostic in patients with advanced non-small cell lung cancers treated with anti-PD-1 antibody. Cancer Immunol. Immunother. CII *67*, 459–470.

Suzuki, K., Kachala, S.S., Kadota, K., Shen, R., Mo, Q., Beer, D.G., Rusch, V.W., Travis, W.D., and Adusumilli, P.S. (2011). Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 5247–5256.

Takeuchi, Y., Tanemura, A., Tada, Y., Katayama, I., Kumanogoh, A., and Nishikawa, H. (2018). Clinical response to PD-1 blockade correlates with a sub-fraction of peripheral central memory CD4+ T cells in patients with malignant melanoma. Int. Immunol. *30*, 13–22.

Tan, H., Wang, S., and Zhao, L. (2017). A tumour-promoting role of Th9 cells in hepatocellular carcinoma through CCL20 and STAT3 pathways. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *44*, 213–221.

Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. Nat. Rev. Immunol. *13*, 412–426.

Tartour, É., Sandoval, F., Bonnefoy, J.-Y., and Fridman, W.H. (2011). Immunothérapie des cancers: Succès récents et perspectives. médecine/sciences *27*, 833–841.

Tatsumi, T., Kierstead, L.S., Ranieri, E., Gesualdo, L., Schena, F.P., Finke, J.H., Bukowski, R.M., Mueller-Berghaus, J., Kirkwood, J.M., Kwok, W.W., et al. (2002). Disease-associated Bias in T Helper Type 1 (Th1)/Th2 CD4+ T Cell Responses Against MAGE-6 in HLA-DRB1*0401+ Patients With Renal Cell Carcinoma or Melanoma. J. Exp. Med. *196*, 619–628.

Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., et al. (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. Sci. Transl. Med. *4*, 127ra37.

Teng, F., Meng, X., Kong, L., and Yu, J. (2018). Progress and challenges of predictive biomarkers of anti PD-1/PD-L1 immunotherapy: A systematic review. Cancer Lett. *414*, 166–173.

Teng, M.W.L., Ngiow, S.F., Ribas, A., and Smyth, M.J. (2015). Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. *75*, 2139–2145.

Tepper, R.I., Coffman, R.L., and Leder, P. (1992). An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. Science *257*, 548–551.

Teralı, K., and Yilmazer, A. (2016). New surprises from an old favourite: The emergence of telomerase as a key player in the regulation of cancer stemness. Biochimie *121*, 170–178.

Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., et al. (2011). IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. Cancer Res. *71*, 5393–5399.

Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A.F., Tartour, E., and Taieb, J. (2013). VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. Cancer Res. *73*, 539–549.

Thiery-Vuillemin, A., Laheurte, C., Mansi, L., Royer, B., Pivot, X., Borg, C., and Adotevi, O. (2014). Immunomodulatory effects of everolimus in a long responsive patient with metastatic renal cell carcinoma. J. Immunother. Hagerstown Md 1997 *37*, 51–54.

Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2018). T Cell Dysfunction in Cancer. Cancer Cell *33*, 547–562.

Thommen, D.S., Schreiner, J., Müller, P., Herzig, P., Roller, A., Belousov, A., Umana, P., Pisa, P., Klein, C., Bacac, M., et al. (2015). Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. Cancer Immunol. Res. *3*, 1344–1355.

Thompson, R.H., Dong, H., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Cheville, J.C., and Kwon, E.D. (2007). PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *13*, 1757–1761.

Tian, L., Goldstein, A., Wang, H., Ching Lo, H., Sun Kim, I., Welte, T., Sheng, K., Dobrolecki, L.E., Zhang, X., Putluri, N., et al. (2017). Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming. Nature *544*, 250–254.

Tie, J., Kinde, I., Wang, Y., Wong, H.L., Roebert, J., Christie, M., Tacey, M., Wong, R., Singh, M., Karapetis, C.S., et al. (2015). Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *26*, 1715–1722.

Tindle, R.W. (1996). Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. Curr. Opin. Immunol. *8*, 643–650.

Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. Cancer Cell *27*, 450–461.

Topalian, S.L., Taube, J.M., Anders, R.A., and Pardoll, D.M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. Nat. Rev. Cancer *16*, 275–287.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer Res. *71*, 1263–1271.

Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P.F., Lu, Y.-C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Somerville, R.P., Hogan, K., Hinrichs, C.S., et al. (2014). Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. Science *344*, 641–645.

Trimble, C.L., Peng, S., Thoburn, C., Kos, F., and Wu, T.C. (2010). Naturally occurring systemic immune responses to HPV antigens do not predict regression of CIN2/3. Cancer Immunol. Immunother. *59*, 799–803.

Truesdell, J., Miller, V.A., and Fabrizio, D. (2018). Approach to evaluating tumor mutational burden in routine clinical practice. Transl. Lung Cancer Res. *7*, 678–681.

Tsuji, T., Altorki, N.K., Ritter, G., Old, L.J., and Gnjatic, S. (2009). Characterization of Preexisting MAGE-A3-Specific CD4 $^{+}$ T Cells in Cancer Patients and Healthy Individuals and Their Activation by Protein Vaccination. J. Immunol. *183*, 4800–4808.

Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J.M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature *515*, 568–571.

Tungatt, K., Bianchi, V., Crowther, M.D., Powell, W.E., Schauenburg, A.J., Trimby, A., Donia, M., Miles, J.J., Holland, C.J., Cole, D.K., et al. (2015). Antibody stabilization of peptide-MHC multimers reveals functional T cells bearing extremely low-affinity TCRs. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *194*, 463–474.

Ubukata, H., Motohashi, G., Tabuchi, T., Nagata, H., Konishi, S., and Tabuchi, T. (2010). Evaluations of interferon-γ/interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. J. Surg. Oncol. *102*, 742–747.

Uchtenhagen, H., Rims, C., Blahnik, G., Chow, I.-T., Kwok, W.W., Buckner, J.H., and James, E.A. (2016). Efficient ex vivo analysis of CD4+ T-cell responses using combinatorial HLA class II tetramer staining. Nat. Commun. *7*.

Valentijn, L.J., Koster, J., Zwijnenburg, D.A., Hasselt, N.E., van Sluis, P., Volckmann, R., van Noesel, M.M., George, R.E., Tytgat, G.A.M., Molenaar, J.J., et al. (2015). TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. Nat. Genet. *47*, 1411–1414.

Van Allen, E.M., Miao, D., Schilling, B., Shukla, S.A., Blank, C., Zimmer, L., Sucker, A., Hillen, U., Foppen, M.H.G., Goldinger, S.M., et al. (2015). Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. Science *350*, 207–211.

Vasquez, J.C., Huttner, A., Zhang, L., Marks, A., Chan, A., Baehring, J.M., Kahle, K.T., and Dhodapkar, K.M. (2017). SOX2 immunity and tissue resident memory in children and young adults with glioma. J. Neurooncol. *134*, 41–53.

Veatch, J.R., Jesernig, B.L., Kargl, J., Fitzgibbon, M., Lee, S.M., Baik, C., Martins, R., Houghton, A.M., and Riddell, S.R. (2019). Endogenous CD4+ T Cells Recognize Neoantigens in Lung Cancer Patients, Including Recurrent Oncogenic KRAS and ERBB2 (Her2) Driver Mutations. Cancer Immunol. Res. *7*, 910–922.

Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. Nat. Immunol. *19*, 108–119.

Végran, F., Berger, H., Boidot, R., Mignot, G., Bruchard, M., Dosset, M., Chalmin, F., Rébé, C., Dérangère, V., Ryffel, B., et al. (2014). The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. Nat. Immunol. *15*, 758–766.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta "reprograms" the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. Nat. Immunol. *9*, 1341–1346.

van de Ven, K., and Borst, J. (2015). Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential. Immunotherapy *7*, 655–667.

Vence, L., Palucka, A.K., Fay, J.W., Ito, T., Liu, Y.-J., Banchereau, J., and Ueno, H. (2007). Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 20884–20889.

Venneri, M.A., De Palma, M., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazzieri, R., Doglioni, C., and Naldini, L. (2007). Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. Blood *109*, 5276–5285.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annu. Rev. Immunol. *29*, 235–271.

Vétizou, M., Pitt, J.M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., et al. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. Science *350*, 1079–1084.

Vetsika, E.-K., Koinis, F., Gioulbasani, M., Aggouraki, D., Koutoulaki, A., Skalidaki, E., Mavroudis, D., Georgoulias, V., and Kotsakis, A. (2014). A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. J. Immunol. Res. *2014*, 659294.

Vigneron, N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. BioMed Res. Int. *2015*, 1–17.

Vigneron, N., and Stroobant, V. (2013). Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. Cancer Immun. *13*, 6.

Vinagre, J., Almeida, A., Pópulo, H., Batista, R., Lyra, J., Pinto, V., Coelho, R., Celestino, R., Prazeres, H., Lima, L., et al. (2013). Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. Nat. Commun. *4*, 2185.

Vollers, S.S., and Stern, L.J. (2008). Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. Immunology *123*, 305–313.

Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L., and Nadler, L.M. (1999). The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. Immunity *10*, 673–679.

Vonderheide, R.H., Schultze, J.L., Anderson, K.S., Maecker, B., Butler, M.O., Xia, Z., Kuroda, M.J., von Bergwelt-Baildon, M.S., Bedor, M.M., Hoar, K.M., et al. (2001). Equivalent induction of telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-bearing patients and healthy individuals. Cancer Res. *61*, 8366–8370.

Voron, T., Colussi, O., Marcheteau, E., Pernot, S., Nizard, M., Pointet, A.-L., Latreche, S., Bergaya, S., Benhamouda, N., Tanchot, C., et al. (2015). VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. J. Exp. Med. *212*, 139–148.

Waki, K., Yamada, T., Yoshiyama, K., Terazaki, Y., Sakamoto, S., Matsueda, S., Komatsu, N., Sugawara, S., Takamori, S., Itoh, K., et al. (2014). PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. Cancer Sci. *105*, 1229–1235.

Waldrop, S.L., Pitcher, C.J., Peterson, D.M., Maino, V.C., and Picker, L.J. (1997). Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. J. Clin. Invest. *99*, 1739–1750.

Walker, J.A., and McKenzie, A.N.J. (2018). TH2 cell development and function. Nat. Rev. Immunol. *18*, 121–133.

Walling, B.L., and Kim, M. (2018). LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. Front. Immunol. *9*, 952.

Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.-Y., Mendrzyk, R., et al. (2012). Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. Nat. Med. *18*, 1254–1261.

Wang, A., Wang, H.Y., Liu, Y., Zhao, M.C., Zhang, H.J., Lu, Z.Y., Fang, Y.C., Chen, X.F., and Liu, G.T. (2015). The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol. *41*, 450–456.

Wang, J., Sanmamed, M.F., Datar, I., Su, T.T., Ji, L., Sun, J., Chen, L., Chen, Y., Zhu, G., Yin, W., et al. (2019a). Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. Cell *176*, 334-347.e12.

Wang, R.F., Wang, X., Atwood, A.C., Topalian, S.L., and Rosenberg, S.A. (1999). Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. Science *284*, 1351–1354.

Wang, W., Yu, D., Sarnaik, A.A., Yu, B., Hall, M., Morelli, D., Zhang, Y., Zhao, X., and Weber, J.S. (2012). Biomarkers on melanoma patient T cells associated with ipilimumab treatment. J. Transl. Med. *10*, 146.

Wang, Y., Lan, G.-B., Peng, F.-H., and Xie, X.-B. (2018). Cancer risks in recipients of renal transplants: a meta-analysis of cohort studies. Oncotarget *9*, 15375–15385.

Wang, Z., Duan, J., Cai, S., Han, M., Dong, H., Zhao, J., Zhu, B., Wang, S., Zhuo, M., Sun, J., et al. (2019b). Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer With Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel. JAMA Oncol. *5*, 696–702.

Ward, J.P., Gubin, M.M., and Schreiber, R.D. (2016). The Role of Neoantigens in Naturally Occurring and Therapeutically Induced Immune Responses to Cancer. Adv. Immunol. *130*, 25–74.

Wei, S.C., Duffy, C.R., and Allison, J.P. (2018). Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. Cancer Discov. *8*, 1069–1086.

Weide, B., Zelba, H., Derhovanessian, E., Pflugfelder, A., Eigentler, T.K., Di Giacomo, A.M., Maio, M., Aarntzen, E.H.J.G., de Vries, I.J.M., Sucker, A., et al. (2012). Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *30*, 1835–1841.

Weide, B., Martens, A., Zelba, H., Stutz, C., Derhovanessian, E., Di Giacomo, A.M., Maio, M., Sucker, A., Schilling, B., Schadendorf, D., et al. (2014). Myeloid-derived suppressor cells predict survival of patients with advanced melanoma: comparison with regulatory T cells and NY-ESO-1- or melan-A-specific T cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *20*, 1601–1609.

Weide, B., Martens, A., Hassel, J.C., Berking, C., Postow, M.A., Bisschop, K., Simeone, E., Mangana, J., Schilling, B., Di Giacomo, A.M., et al. (2016). Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *22*, 5487–5496.

Welters, M.J.P., van der Logt, P., van den Eeden, S.J.F., Kwappenberg, K.M.C., Drijfhout, J.W., Fleuren, G.J., Kenter, G.G., Melief, C.J.M., van der Burg, S.H., and Offringa, R. (2006). Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. Int. J. Cancer *118*, 950–956.

Welters, M.J.P., Gouttefangeas, C., Ramwadhdoebe, T.H., Letsch, A., Ottensmeier, C.H., Britten, C.M., and van der Burg, S.H. (2012). Harmonization of the intracellular cytokine staining assay. Cancer Immunol. Immunother. *61*, 967–978.

Weng, N., Araki, Y., and Subedi, K. (2012). The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. Nat. Rev. Immunol. *12*, 306–315.

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. Nat. Immunol. *12*, 492–499.

Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat. Rev. Immunol. *15*, 486–499.

Whiteside, T.L., Schuler, P., and Schilling, B. (2012). Induced and natural regulatory T cells in human cancer. Expert Opin. Biol. Ther. *12*, 1383–1397.

Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. Nature *441*, 890–893.

Wolf, Y., Anderson, A.C., and Kuchroo, V.K. (2019). TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. Nat. Rev. Immunol.

Wölfl, M., and Greenberg, P.D. (2014). Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. Nat. Protoc. *9*, 950–966.

Wooldridge, L., Lissina, A., Cole, D.K., van den Berg, H.A., Price, D.A., and Sewell, A.K. (2009). Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. Immunology *126*, 147–164.

Wu, C., Zhu, Y., Jiang, J., Zhao, J., Zhang, X.-G., and Xu, N. (2006). Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. Acta Histochem. *108*, 19–24.

Wu, K.J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., and Dalla-Favera, R. (1999). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. Nat. Genet. *21*, 220–224.

Wu, P., Wu, D., Li, L., Chai, Y., and Huang, J. (2015). PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. PloS One *10*, e0131403.

Wu, T.-C., Lin, P., Hsu, C.-P., Huang, Y.-J., Chen, C.-Y., Chung, W.-C., Lee, H., and Ko, J.-L. (2003). Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. Lung Cancer Amst. Neth. *41*, 163–169.

Wu, X., Li, J., Connolly, E.M., Liao, X., Ouyang, J., Giobbie-Hurder, A., Lawrence, D., McDermott, D., Murphy, G., Zhou, J., et al. (2017). Combined Anti-VEGF and Anti-CTLA-4 Therapy Elicits Humoral Immunity to Galectin-1 Which Is Associated with Favorable Clinical Outcomes. Cancer Immunol. Res. *5*, 446–454.

Xu, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Chen, N., Zhou, J., and Liu, L. (2017). The role of serum angiopoietin-2 levels in progression and prognosis of lung cancer: A meta-analysis. Medicine (Baltimore) *96*, e8063.

Yang, G., Shen, W., Zhang, Y., Liu, M., Zhang, L., Liu, Q., Lu, H.H., and Bo, J. (2017). Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer. Oncotarget *8*, 38378–38388.

Yang, Z.-Z., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A.J., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2012). IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. J. Clin. Invest. *122*, 1271–1282.

Yao, Y., Bellon, M., Shelton, S.N., and Nicot, C. (2012). Tumor suppressors p53, p63TAα, p63TAy, p73α, and p73β use distinct pathways to repress telomerase expression. J. Biol. Chem. *287*, 20737–20747.

Yarchoan, M., Hopkins, A., and Jaffee, E.M. (2017a). Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. N. Engl. J. Med. *377*, 2500–2501.

Yarchoan, M., Johnson, B.A., Lutz, E.R., Laheru, D.A., and Jaffee, E.M. (2017b). Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. Nat. Rev. Cancer *17*, 209–222.

Yin, L., Hubbard, A.K., and Giardina, C. (2000). NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. J. Biol. Chem. *275*, 36671–36675.

Yoon, N.K., Maresh, E.L., Shen, D., Elshimali, Y., Apple, S., Horvath, S., Mah, V., Bose, S., Chia, D., Chang, H.R., et al. (2010). Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. Hum. Pathol. *41*, 1794–1801.

Yuan, J., Adamow, M., Ginsberg, B.A., Rasalan, T.S., Ritter, E., Gallardo, H.F., Xu, Y., Pogoriler, E., Terzulli, S.L., Kuk, D., et al. (2011). Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 16723–16728.

Zander, R., Schauder, D., Xin, G., Nguyen, C., Wu, X., Zajac, A., and Cui, W. (2019). CD4+ T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8+ T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer. Immunity *51*, 1028-1042.e4.

Zanetti, M. (2015). Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *194*, 2049–2056.

Zanetti, M. (2017). A second chance for telomerase reverse transcriptase in anticancer immunotherapy. Nat. Rev. Clin. Oncol. *14*, 115–128.

Zaretsky, J.M., Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D.Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L., et al. (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. N. Engl. J. Med. *375*, 819–829.

Zelba, H., Weide, B., Martens, A., Derhovanessian, E., Bailur, J.K., Kyzirakos, C., Pflugfelder, A., Eigentler, T.K., Di Giacomo, A.M., Maio, M., et al. (2014). Circulating CD4+ T Cells That Produce IL4 or IL17 When Stimulated by Melan-A but Not by NY-ESO-1 Have Negative Impacts on Survival of Patients with Stage IV Melanoma. Clin. Cancer Res. *20*, 4390–4399.

Zhang, J., Yao, Y.-H., Li, B.-G., Yang, Q., Zhang, P.-Y., and Wang, H.-T. (2015). Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. Sci. Rep. *5*, 9800.

Zhang, K., Guo, Y., Wang, X., Zhao, H., Ji, Z., Cheng, C., Li, L., Fang, Y., Xu, D., Zhu, H.H., et al. (2017). WNT/β-Catenin Directs Self-Renewal Symmetric Cell Division of hTERThigh Prostate Cancer Stem Cells. Cancer Res. *77*, 2534–2547.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., et al. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. N. Engl. J. Med. *348*, 203–213.

Zhang, S., Ma, X., Zhu, C., Liu, L., Wang, G., and Yuan, X. (2016). The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. PloS One *11*, e0164514.

Zhao, B., Zhao, H., and Zhao, J. (2019). Impact of clinicopathological characteristics on survival in patients treated with immune checkpoint inhibitors for metastatic melanoma. Int. J. Cancer *144*, 169–177.

Zheng, H., Liu, X., Zhang, J., Rice, S.J., Wagman, M., Kong, Y., Zhu, L., Zhu, J., Joshi, M., and Belani, C.P. (2016). Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer. Oncotarget *7*, 56233–56240.

Zhenjiang, L., Rao, M., Luo, X., Valentini, D., von Landenberg, A., Meng, Q., Sinclair, G., Hoffmann, N., Karbach, J., Altmannsberger, H.-M., et al. (2018). Cytokine Networks and Survivin Peptide-Specific Cellular Immune Responses Predict Improved Survival in Patients With Glioblastoma Multiforme. EBioMedicine *33*, 49–56.

Zhou, J., Mahoney, K.M., Giobbie-Hurder, A., Zhao, F., Lee, S., Liao, X., Rodig, S., Li, J., Wu, X., Butterfield, L.H., et al. (2017). Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. Cancer Immunol. Res. *5*, 480–492.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood *112*, 1557–1569.

Zhu, X., and Lang, J. (2017). Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. Oncotarget *8*.

Zhu, C.-Q., Cutz, J.-C., Liu, N., Lau, D., Shepherd, F.A., Squire, J.A., and Tsao, M.-S. (2006). Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. Br. J. Cancer *94*, 1452–1459.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annu. Rev. Immunol. *28*, 445–489.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M.J., and Kroemer, G. (2013). Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. Immunity *39*, 74–88.

Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. *10*, 248–256.

Zuazo, M., Arasanz, H., Fernández-Hinojal, G., García-Granda, M.J., Gato, M., Bocanegra, A., Martínez, M., Hernández, B., Teijeira, L., Morilla, I., et al. (2019). Functional systemic CD4 immunity is required for clinical responses to PD-L1/PD-1 blockade therapy. EMBO Mol. Med. *11*, e10293.

Annexes

Annexe 1 : Liste non exhaustive d'études de monitoring des réponses T spécifiques d'antigènes de tumeurs détectées dans le sang de patients atteints de cancer avant tout traitement

Type de cancer étudié	Antigènes ciblés	Technique	Type de réponses T	Relevance clinique	Référence
Cancer colorectal	Ep-CAM, her2/neu, CEA	**ELISPOT IFN-γ**	CD8	Non évaluée	Nagorsen, Cancer Research, 2000
Cancer colorectal	Ep-CAM, her-2/neu, CEA	**ELISPOT et ICS**	CD8	**Oui**	Nagorsen D, J Transl Med. 2005
Mélanome et leucémie aigue	PRAME	**ELISPOT et tétramère**	CD8	Non évaluée	Griffioen, Clin Can Res, 2006
Melanome	NY-ESO-1	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Zarour , Cancer Res, 2002
Ovaire	NYESO1	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Qian F, Cancer Immun, 2004
Cancer du poumon NSCLC	MAGE-A3	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Tsuji T, J Immunol, 2009
Cancer du foie	alpha-fetoprotein	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Alisa A, Clin Cancer Res, 2005
Cancer du poumon NSCLC	TERT	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Godet Y , CCR, 2012
Cancer du poumon NSCLC	TERT	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Laheurte, OncoImmunology, 2016
Mélanome	MelanA/MART1	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Bioley G, J Immunol, 2006
Cancer du colon	5T4	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Scurr, CIR, 2013
Cancer du col de l'utérus	HPV	**ELISPOT IFN-γ**	CD4	Non évaluée	Welters , Int J Cancer, 2006
Cancer de l'ovaire	CA125	**ELISPOT IFN-γ**	CD4 et CD8	Non évaluée	Schultes BC, J Immunol Methods, 2003
Cancer du rein	EphA2	**ELISPOT IFN-γ**	CD4 et CD8	Non évaluée	Tatsumi, Cancer Res, 2003
Cancer colorectal	NY-CO-58/KIF2C	**ELISPOT IFN-γ**	CD4 et CD8	Non évaluée	Gnjatic S, Int J Cancer, 2010
Cancer du poumon NSCLC et	TERT, MAGE A3, g250, PRAM RHAM, survivine, her2 WT1	**ELISPOT IFN-γ**	CD4 et CD8	Non évaluée	Babiak A, Oncol Rep, 2014
Cancer du foie	16 TAA dont TERT, NY-ESO-1, survinine, WT1	**ELISPOT IFN-γ**	CD8	Non évaluée	Inada Y, Hepathology, 2019
Cancer du foie	TERT	**ELISPOT IFN-γ**	CD8	Non évaluée	Mizukoshi E, Hepathology, 2006
Cancer du foie	14 TAA dont TERT	**ELISPOT IFN-γ**	CD8	Non évaluée	Mizukoshi E, Hepathology, 2011
Mélanome et cancer du sein	TRAG-3	**ELISPOT IFN-γ et ICS**	CD4	Non évaluée	Janjic B, J Immunol, 2006
Testicule	MAGE A 1, A3, A4 et NY	**ELISPOT IFN-γ, ICS, tétramère**	CD8 et CD4	Non évaluée	Pearce, E J Immuno, 2017
Cancer du sein	MUC-1,-Her-2/neu, NY-ESO-1, SSX2 MAGE	**ELISPOT IFN-γ, ICS, tétramère, qRT PCR IFN-γ**	CD8	Non évaluée	Rentzsch, CCR, 2003
Mélanome, sein, ovaire, prostate,	NYESO-1	**ELISPOT IFN-γ, Tétramère**	CD8	Non évaluée	Jager E, PNAS, 2000
NSCLC	14 TAA dont Aurora Kinase, p53, RHAM, NY-ESO-1, CEA, Prame	**ELISPOT IFNy**	CD8	**Oui**	Safi, Oncoimunology, 2017
Cancer du col de l'utérus	HPV E1	**ELISPOT IFNy**	non précisé	**Oui**	Ma M, Infect Agent Cancer, 2018
Cancer colorectal	CEA et 5T4	**ELISPOT IFNy**	CD4 et CD8	**Oui**	Scurr MJ, JNCI, 2015
Cancer colorectal	CEA et 5T4	**ELISPOT IFNy**	CD4	**Oui**	Betts G, Gut. 2012
Leucémie myéloide	RHAMM/HMMR, PRAME, G250/CA9	**ELISPOT IFNy**	CD8	**Oui**	Greiner J, Blood, 2006
Cancer du col de l'utérus	HPV 16 E6 et E7	**ELISPOT IFNy**	CD4 et CD8	**Oui**	Trimble, CII, 2010
Cancer du col de l'utérus	HPV 16 E7	**ELISPOT IFNy et ICS**	CD4	**Oui**	Peng S, Clin Cancer Res, 2007
Mélanome et cancer du rein	MAGE-6	**ELISPOT IFNy et IL5**	CD4	**Oui**	Tatsumi, J Exp Med, 2002
Cancer du colon	Survivine	**ELISPOT,téramère**	CD8 et CD4	Non évaluée	Casati, Canc Res, 2003
Mélanome	SSX-4	**ICS**	CD4	Non évaluée	Ayyoub, J Immunol, 2005
Myélome	MAGE C1	**ICS**	CD4	Non évaluée	Nuber N, Leukemia, 2013
Mélanome	Meleo1	**ICS**	CD4	Non évaluée	Bobinet, PloS One, 2012
Cancer du pancréas	mesothelin	**ICS**	CD4	Non évaluée	Chen Y, PLoS One, 2014
Mélanome	300 peptides	**ICS**	CD4 et CD8	Non évaluée	Chevalier, Oncoimmunology, 2015
Cancer du sein	HER2	**ICS**	CD4 et CD8	**Oui**	Bailur, Breast cancer Res, 2015
Mélanome	NY-ESO-1 et Melan-A	**ICS**	CD4 et CD8	**Oui**	Zelab H, Clin Cancer Res, 2014
Melanome	NY-ESO-1 et Melan-A	**ICS**	CD4 et CD8	**Oui**	Weide B, Clin Cancer Res, 2014
Mélanome	NY-ESO-1, Melan-A, Mage3 et Survivine	**ICS**	CD4 et CD8	**Oui**	Weide B, JCO,2012
Gammopathie	SOX2	**ICS**	CD4 et CD8	**Oui**	Spisek, J exp med, 2003
Gammopathie monoclonale	SOX2	**ICS**	CD4 et CD8	**Oui**	Dhodapkar, 2015
Cancer tête et cou	MAGE-A3 MAGE-A4	**ICS**	CD4	Non évaluée	Cesson V, CII, 2011
Mélanome	MAGE-C1/CT7	**ICS**	CD4	Non évaluée	Nuber N, PNAS, 2010
Cancer du foie	alpha foetoprotein	**ICS**	CD4	Non évaluée	Alisa A, Clin Cancer Res, 2005
Cancer du foie	NYESO-1	**ICS**	CD4 et CD8	Non évaluée	Korany F, Clin Cancer Res, 2004
Cancer du foie	AFP, GPC3, NY-ESO-1 MAGE-1	**ICS**	CD8	**Oui**	Flecken T, Hepatology. 2014
Cancer du rein	Cycline D1, Mage A9, NY-ESO-1, RAGE-1….	**ICS, tétramère**	CD8	Non évaluée	Dannenmann SR, CIR, 2013
Cancer du sein	HER2, MUC1 et survivine	**ICS**	CD4 et CD8	**Oui**	Janssen, Breast Cancer , 2017
Cancer de l'ovaire	NYESO-1	**Tétramère**	CD4	Non évaluée	Redjimi N, Plos One, 2011
Cancer de l'ovaire	NYESO1	**Tétramère**	CD4	Non évaluée	Ayyoub M, Cancer Immunol Res, 2013
Cancer du poumon	MAGE-A1 and MAGE-A3 hTERT	**Tétramère**	CD8	Non évaluée	Karanikas V, Immunol Cell Biol, 2010
Glioblastome	survivine	**Tétramère**	CD8	Non évaluée	Coughlin, J Clin Oncol, 2006

Cancer du poumon	survivine	**Tétramère**	CD8	Non évaluée	Karanikas , Clin Immunol, 2008
Cancer du sein	TERT	**Tétramère**	CD8	Non évaluée	Amarnath, Int J oncol, 2004
Mélanome	MART-1, Tyrosinase, et gp100	**Tétramère**	CD8	**Oui**	Van Oijen, Clin Cancer Res, 2004
Mélanome	NYESO1	**Tetramère**	CD8	Non évaluée	Valmori D, Cancer Res, 2000
Mélanome	NYESO1	**Tétramère et ELISA**	CD4	Non évaluée	Ayyoub, Clin Immunol, 2006
Prostate, poumon, mélanome	TERT	**Tétramère, ELISPOT IFN-γ**	CD8	Non évaluée	Vonderheide, Cancer Res, 2001
Leucémie myéloide	TERT, WT1	**Tétramères, ICS**	CD8	Non évaluée	Gannagé M, JI, 2006
Cancer du colon	CEA	**Prolifération**	CD4	Non évaluée	Campi G, Cancer Res, 2003
Leucémie	TERT	**Prolifération**	CD4 et CD8	Non évaluée	Kokhaei P, Exp Hematol, 2007
Glioblastome	SOX2	**Prolifération, ELISA CXCL10**	CD8	**Oui**	Vasquez , J Neurooncol, 2017
Cancer du pancréas	CEA	**Prolifération et ELISA**	CD4	Non évaluée	Tassi E, J Immunol, 2008
Col de l'utérus	HPV 18 E6 et E4	**Prolifération et ELISA**	CD4	Non évaluée	Seresini S, Immunology, 2010
Myélome	survivine	**Prolifération, ELISA**	CD4	Non évaluée	Locke FL, J Immunother Cancer, 2015
Glioblastome	NY-ESO-1, Survivne	**Prolifération, ELISA, ICS**	CD8 et CD4	Non évaluée	Liu Z, CII, 2018
Lymphome non hodgkinien	WT1	**CD8 CD137, ICS**	CD8	**Oui**	Israyelyan, Leuk lymphoma, 2013
Gammopathie monoclonale	HPV16 E6 E7	**ELISA IL2**	Non précisée	Non évaluée	Bontkes HJ, Int J cancer 2000
Glioblastome	Survivine	**ELISA IFN-γ**	CD4 et CD8	**Oui**	Zhenjiang, EBioMedicine, 2018
Col de l'utérus	HPV 18 E6	**ELISA IFN-γ, prolifération**	CD4	**Oui**	Seresini S, J Immunol, 2007
Cancer gastriques	MUC-1, CEA, her2/neu	**qRT PCR IFN-γ**	CD8	Non évaluée	Dittmann J, CII, 2005
Leucémie	WT1	**qRT PCR IFN-γ, Tétramère**	CD8	Non évaluée	Rezvani K, Clin Can res, 2005

	Protocol ID	ClinicalTrials.gov ID	Brief Title	Record Status	Last Update
Open	P/2018/395		Evaluation of the Interest of Multidrug Therapy With XELOXIRI-3 in Elderly or Frail Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (ALIX)	In Progress	05/10/2019 04:35
Open	Epitopes-HPV02	NCT02402842	Clinical and Biological Interest of Taxanes in Advanced Squamous Cell Anal Carcinoma (Epitopes-HPV02)	In Progress	05/10/2019 03:39
Open	API/2016/73	NCT03117972	Chemotherapy Intensification in Patients With High Lactate Dehydrogenase Values and Soluble Syndecan1 Levels (CLavSyn)	Public	04/09/2019 08:33
Open	API/2015/61	NCT02838342	Pharmaco-immunological Study of Interferon-alpha and Metronomic Cyclophosphamide Association in Neuroendocrine Tumors (EPICentro)	Public	12/21/2018 03:40
Open	UCPVax	NCT02818426	Universal Cancer Peptide-based Vaccination in Metastatic NSCLC (UCPVax)	Public	12/21/2018 03:35
Open	Pancreas-CGE	NCT02818907	Evaluation of Survival Prognostic Factors for Patients With Exocrine Pancreatic Cancer Resectable or Potentially Resectable (Pancreas-CGE)	Entry Completed	12/21/2018 03:33
Open	API/2015/58	NCT02840058	Interest of Anti-telomerase T CD4 Immune Responses for Predicting the Effectiveness of Immunotherapies Targeting PD1 / PDL1 (ITHER)	Public	12/21/2018 03:33
Open	API/2016/67	NCT03117946	Modulation of Anti-tumor T Cell Responses in Cancer Patients Treated by Concomitant Radiochemotherapy (i-RTCT)	Public	12/21/2018 03:31
Open	Epitopes-CRC02	NCT02817178	Study for Validation of Immunological Biomarkers in Patients With Metastatic Colorectal Cancer (Epitopes-CRC02)	Public	11/30/2018 04:09
Open	IPEC-GC	NCT01830270	Preoperative Dose-dense Chemotherapy With Weekly Cisplatin, Epirubicin and Paclitaxel to Treat Patients With Locally Gastric Cancer (IPEC-GC)	Public	07/24/2018 07:48
Open	P/2015/263	NCT02842333	Study of Predictive Immunological Parameters of Molecular Complete Remission in Patients With Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase and Treated With Tyrosine Kinase Inhibitor (PAMIR01)	Public	06/29/2018 05:43
Open	P/2013/207	NCT02846103	Study of Anti-telomerase T CD4 Immunity in Metastatic Lung Cancer (Telocap02)	Public	01/23/2018 05:00
Open	P/2015/244	NCT02842320	Targeting Leukemic Stem Cell Expressing the IL-1RAP Protein in Chronic Myelogenous Leukemia (CML) (CAR-LMC)	Public	10/16/2017 08:12
Open	P/2013/204	NCT03311919	Exploratory Study of "Natural Killer" Inflammatory Lymphocytes in Waste Per-operating of Tonsillectomy (LINK)	Public	09/29/2017 09:20
Open	Epitope-HPV01	NCT01845779	Evaluation of Immune Response Against Human Papillomavirus (HPV)in Patients With Metastatic Cancer of the Anal Canal (Epitopes-HPV01)	Public	08/04/2016 03:06
Open	P/2012/157	NCT02844491	Study of T Specific Immune Response Against Delta-CD20 Peptide in Hematological Malignancies B (Epitopes-LNH01)	Public	07/25/2016 13:29
Open	N2005/48-A	NCT02845999	Allogenic Immunotherapy Based on Natural Killer (NK) Cell Adoptive Transfer in Metastatic Gastrointestinal Carcinoma Treated With Cetuximab (NK-EGFR01)	Public	07/22/2016 09:13
Open	T/2011/03	NCT02838433	Study of Anti-telomerase T CD4 Immunity in Melanoma (LyTéloMel)	Public	07/19/2016 10:42
Open	P/2011/117	NCT02838381	Study of Genetic and Cellular Immunological Parameters Predictive of Disease-free Survival in Patients With Metastatic Cancer (Epitopes-CRC01)	Public	07/19/2016 10:36
Open	P/2015/279	NCT02839291	Evaluation of Medical Practice in the Management of Bone Metastases After Injectable Bone Antiresorptive Treatment, and Its Influence on Quality of Life (PRISM)	Public	07/18/2016 10:48
Open	API/2014/48	NCT02837757	Everolimus Modulation of Anti-tumor T CD4 Immune Responses (EMIR)	Public	07/15/2016 03:02
Open	CDR0000564118	NCT00544011	Bevacizumab and Combination Chemotherapy in Treating Patients With Metastatic Colorectal Cancer (Folfiri3Avastin)	In Progress	06/29/2016 06:16
Open	EROS	NCT02821559	Biweekly Versus Triweekly Raltitrexed With Oxaliplatin (With or Without Bevacizumab) in First-line Metastatic Colorectal Cancer (EROS)	Public	06/29/2016 04:12

Annexe 3

OncoImmunology

ISSN: (Print) 2162-402X (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/koni20

Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4$^+$ Th1 responses against telomerase in cancer patients

Caroline Laheurte, Jeanne Galaine, Laurent Beziaud, Magalie Dosset, Jerome Kerzerho, Claire Jacquemard, Béatrice Gaugler, Christophe Ferrand, Anne Dormoy, François Aubin, Pascale Jacoulet, Virginie Westeel, Christophe Borg, Eric Tartour, Yann Godet, Bernard Maillère & Olivier Adotévi

To cite this article: Caroline Laheurte, Jeanne Galaine, Laurent Beziaud, Magalie Dosset, Jerome Kerzerho, Claire Jacquemard, Béatrice Gaugler, Christophe Ferrand, Anne Dormoy, François Aubin, Pascale Jacoulet, Virginie Westeel, Christophe Borg, Eric Tartour, Yann Godet, Bernard Maillère & Olivier Adotévi (2016) Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4$^+$ Th1 responses against telomerase in cancer patients, OncoImmunology, 5:5, e1137416, DOI: 10.1080/2162402X.2015.1137416

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1137416

View supplementary material

Accepted author version posted online: 18 Feb 2016.
Published online: 18 Feb 2016.

Submit your article to this journal

Article views: 14

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=koni20

Download by: [Simon Fraser University] **Date:** 01 August 2016, At: 13:36

ONCOIMMUNOLOGY
2016, VOL. 5, NO. 5, e1137416 (12 pages)
http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1137416

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL RESEARCH

Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4$^+$ Th1 responses against telomerase in cancer patients

Caroline Laheurte[a,b,*], Jeanne Galaine[a,c,*], Laurent Beziaud[a,c], Magalie Dosset[a,c], Jerome Kerzerho[d], Claire Jacquemard[b], Béatrice Gaugler[a,b,c], Christophe Ferrand[a,b], Anne Dormoy[b], François Aubin[e], Pascale Jacoulet[f], Virginie Westeel[f], Christophe Borg[a,b,c,g], Eric Tartour[h], Yann Godet[a,c], Bernard Maillère[d], and Olivier Adotévi[a,c,g]

[a]INSERM, UMR1098, LabEx LipSTIC, Besançon, France; [b]EFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, INSERM CIC1431, Besançon, France; [c]Univ. Bourgogne Franche-Comté, UMR1098, Besançon, France; [d]CEA, iBiTecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), Labex LERMIT, Labex VRI, Gif Sur Yvette, France; [e]Department of Dermatology, University Hospital of Besançon, EA3181, SFR4234, Besançon cedex, France; [f]Department of Pneumology, University Hospital of Besançon, Besançon cedex, France; [g]Department of Medical Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon cedex, France; [h]INSERM, UMR970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France, Department of Biological Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

ABSTRACT

Cumulative evidence supports that CD4$^+$ Th1 cells play a key role in antitumor immunity. We previously reported the presence of spontaneous HLA-DR-restricted CD4$^+$ Th1 responses against telomerase reverse transcriptase (TERT) in various cancers by using promiscuous HLA-DR epitopes. Here, we described novel highly immunogenic HLA-DP4-binding epitopes from TERT named TERT$_{541–555}$, TERT$_{573–587}$, TERT$_{613–627}$ and TERT$_{911–925}$ and addressed the question about the immunoprevalence and magnitude of the naturally occurring antitumor CD4$^+$ T cell responses restricted by HLA-DP4 or HLA-DR, the two most common HLA class II. Direct comparative study of spontaneous anti-TERT CD4$^+$ T cell responses in a cohort of 87 lung cancer patients showed that HLA-DP4 and HLA-DR sustained specific Th1 responses in 10.1% and 25.2% of cancer patients respectively ($p = 0.01$). The magnitude of the HLA-DR-restricted responses was two to three times significantly higher than HLA-DP one ($p = 0.005$). Similar results were found in other cancers such as melanoma, breast cancer, renal cell carcinoma and colon cancer. Thus, our results describe for the first time in a large cohort of cancer patients a high immunoprevalence of HLA-DR-restricted spontaneous anti-TERT Th1 immunity compared to HLA-DP restriction. These results provide a new tool for comprehensive monitoring of antitumor CD4$^+$ Th1 response in various cancers.

Abbreviations: HLA, human leucocyte antigen; MHC, major histocompatibility complex; moDC, monocyte-derived dendritic cell; NSCLC, non-small cell lung cancer; TERT, human telomerase reverse transcriptase; UCP, universal cancer peptide

ARTICLE HISTORY
Received 2 September 2015
Revised 18 December 2015
Accepted 28 December 2015

KEYWORDS
CD4$^+$ Th1 cells; HLA-DP4; HLA-DR; telomerase; immunomonitoring

Introduction

Due to their central role in orchestrating the antitumor immunity, tumor-specific CD4$^+$ T cells gained considerable interest for cancer immunotherapy during the past decade.[1] Typically, CD4$^+$ T cells recognize peptides of 12–15 amino acids in length presented by MHC class II molecules. Among the various subpopulations of CD4$^+$ helper T cells regulating immune response, the CD4$^+$ Th1 subset that produces IFNγ, TNF-α and IL-2, mainly controls cell-mediated immunity against tumors.[2] Cumulative studies have shown that CD4$^+$ Th1 cells mediate tumor protection by secreting IFNγ, which mediate cytotoxicity against tumor cells synergistically with TNF-α while also by inducing reactive oxygen species and nitric oxide inhibiting angiogenesis and by stimulating NK cells and cytotoxic type 1 macrophages.[3] More importantly, only tumor-reactive CD4$^+$ T cells have been found to ensure efficient effector cytotoxic T lymphocytes (CTL) recruitment at the tumor site and this effect was promoted by IFNγ-dependent production of chemokines such as CXCL9 and CXCL10.[4,5] In cancer patients, CD4$^+$ T cell responses against tumor antigens have been detected in periphery and at the tumor site.[6-10] Accordingly, high density of tumor-infiltrating Th1 cells has been identified as a good prognostic marker in several human cancers.[11] Studies in melanoma patients demonstrated the interest to use tumor reactive helper peptides rather than peptides derived from non-tumor antigen for vaccine efficacy.[12-16] Furthermore, it has been shown that the presence of CD4$^+$ T cells contributes to the efficacy of conventional chemotherapy suggesting a synergy between the treatment and antitumor CD4$^+$ T cell immunity.[17-19] More recently, it has been shown in a mouse model and melanoma patients that the majority of immunogenic neo-antigens or mutanome is frequently recognized by CD4$^+$ T cells.[20,21] In addition, the immunization with CD4$^+$ T immunogenic neo-epitopes confers strong antitumor response.[20] This observation underlines the critical role of CD4$^+$ T cells immunity in cancer immunosurveillance.

CONTACT Olivier Adotévi olivier.adotevi@univ-fcomte.fr
*Contributed equally.
Supplemental material data for this article can be accessed on the publisher's website.
© 2016 Taylor & Francis Group, LLC

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

However, neo-epitopes targeting strategy meets several hurdles.[22] Then, we believe that the identification of MHC class II-binding peptides from shared tumor antigens may contribute to a better analysis of $CD4^+$ Th1 responses in cancer patients.

TERT, the catalytic subunit of the telomerase, represents the prototype of widely overexpressed and shared tumor antigen.[23,24] The reactivation of telomerase during human tumorigenesis is the predominant mechanism developed by malignant cells to escape telomere-dependent cell death.[25,26] Consequently, TERT is widely expressed in all types of studied cancers (>90% of all cancers).[27] Besides maintaining telomere length, TERT also plays a crucial role in oncogenesis by providing proliferation, survival and anti-apoptotic signals.[28] More recently, high frequency of TERT promoter mutations was found in several cancers in which they lead to an enhanced expression of TERT and an increase in telomere length.[29-31] All these properties raise TERT to the rank of a hallmark of cancer cells.[23,24] HLA-DR-restricted epitopes derived from TERT that stimulate specific $CD4^+$ T cell responses have been previously described.[32,33] More recently, we identified highly promiscuous HLA-DR-binding peptides derived from TERT called universal cancer peptides (UCP). These peptides have been designed to cover a large proportion of the population (around 80%) and to especially stimulate Th1-polarized $CD4^+$ T cells.[19,34] By using UCP, we detected naturally occurring HLA-DR-restricted $CD4^+$ Th1 responses against TERT in several human cancers [19,34].Furthermore, in lung cancer patients, the presence of this spontaneous anti-TERT Th1 response was associated with a better outcome.[19,35]

Previous studies suggested that HLA-DR molecules were more frequently involved in $CD4^+$ T cell responses against tumor antigens than HLA-DP4 molecules.[7,36-38] The HLA-DP4 allotype consists of two molecules, DP401 (DPA1*0103/DPB1*0401) and DP402 (DPA1*0103/DPB1*0402), which differ from each other by only three aa residues. One or both HLA-DP4 molecules are carried by around 75% of Caucasian individuals.[39] However, the spontaneous HLA-DP4-restricted $CD4^+$ T cell responses against TERT have not been extensively studied in cancer patients. In this study, we assessed if HLA-DP4 molecules, can sustain TERT-specific $CD4^+$ Th1 responses and addressed the question about immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted anti-TERT $CD4^+$ Th1 responses naturally occurring in cancer patients.

Results

Binding capacity and immunogenicity of TERT-derived HLA-DP4 peptides in healthy individuals

A set of 22 peptides was first selected from the whole sequence of TERT according to their prediction score to bind to HLA-DP401 molecule.[40] These predicted peptides were synthetized and then evaluated in binding assays specific to HLADP401 and HLADP402 molecules. We showed that 14 out of 22 predicted peptides (64%) bind with a good or moderate affinity to HLA-DP0401 (Table 1). Although two peptides only were expected to bind tightly to HLA-DP401 (IC50 inferior to 100 nM), the binding assays revealed seven good binders that we included in the same pool of peptides (pool A). Seven other peptides according to their prediction scores exhibited a moderate affinity and were retained to constitute a pool of moderate binders (pool B). Although other peptides were also predicted, they bound weakly to HLA-DP0401 (data not shown). A good correlation was observed between the binding values obtained with the two HLA-DP4 allotypes according to their minor sequence differences[39] except for three out of the 14 peptides ($TERT_{456–470}$, $TERT_{659–673}$ and $TERT_{553–567}$).

To investigate whether HLA-DP4-resticted peptides could be recognized by human $CD4^+$ T cells, we performed *in vitro* peptide stimulation. Blood lymphocytes from healthy donors were cultured either with the pool of HLA-DP4 strong binder peptides (pool A) or with the pool of intermediate binders (pool B) for 2 weeks and specificity of T cells was assessed by IFNγ ELISPOT assay. As shown in Fig. 1, the stimulation with pool A peptides induced specific T cells against two peptides referred as $TERT_{541–555}$ and $TERT_{573–587}$ in the four consecutive donors tested. From pool B peptides (intermediate

Table 1. Prediction and binding capacities to HLA-DP4 molecules of TERT-derived peptides.

	hTERT peptides	Sequences															Score peptide[a] DP401	Relative activity[b] DP401	Relative activity[b] DP402
Strong binders Pool A	TERT 911–925	D	E	A	L	G	G	T	A	F	V	Q	M	P	A	H	30	11	22
	TERT 573–584	L	F	F	Y	R	K	S	V	W	S	K	L	Q	S	I	120	73	37
	TERT 541–555	L	A	K	F	L	H	W	L	M	S	V	Y	V	V	E	160	32	17
	TERT 833–847	Q	G	S	I	L	S	T	L	L	C	S	L	C	Y	G	180	56	142
	TERT 357–371	A	R	R	L	V	E	T	I	F	L	G	S	R	P	W	270	5	2
	TERT 386–400	Y	W	Q	M	R	P	L	F	L	E	L	L	G	N	H	360	77	17
	TERT 549–563	M	S	V	Y	V	V	E	L	L	R	S	F	F	Y	V	360	65	43
Intermediate binders Pool B	TERT 456–470	S	S	P	W	Q	V	Y	G	F	V	R	A	C	L	R	160	928	11
	TERT 659–673	K	A	L	F	S	V	L	N	Y	E	R	A	R	R	P	160	348	7
	TERT 93–107	A	K	N	V	L	A	F	G	F	A	L	L	D	G	A	220	308	371
	TERT 553–567	V	V	E	L	L	R	S	F	F	Y	V	T	E	T	T	240	374	21
	TERT 10–24	V	R	S	L	L	R	S	H	Y	R	E	V	L	P	L	240	3476	727
	TERT 613–627	R	P	A	L	L	T	S	R	L	R	F	I	P	K	P	360	106	311
	TERT 533–547	E	H	R	L	R	E	E	I	L	A	K	F	L	H	W	360	407	3583

[a]Score peptide: binding prediction of TERT peptide to HLA-DP401 molecule was performed with algorithm prediction software.
[b]Relative activity: peptides encompassing the whole sequence of TERT were submitted to binding assays specific for HLA-DP4 molecules by competitive ELISA (as described in the materials and methods section). Data are expressed as relative avidity RA (ratio of the IC_{50} of TERT peptides to the IC_{50} of the reference peptide) and are the means of three experiments. Good binders have an RA less than 100 and intermediate binders have a RA more than 100 and less than 500.

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

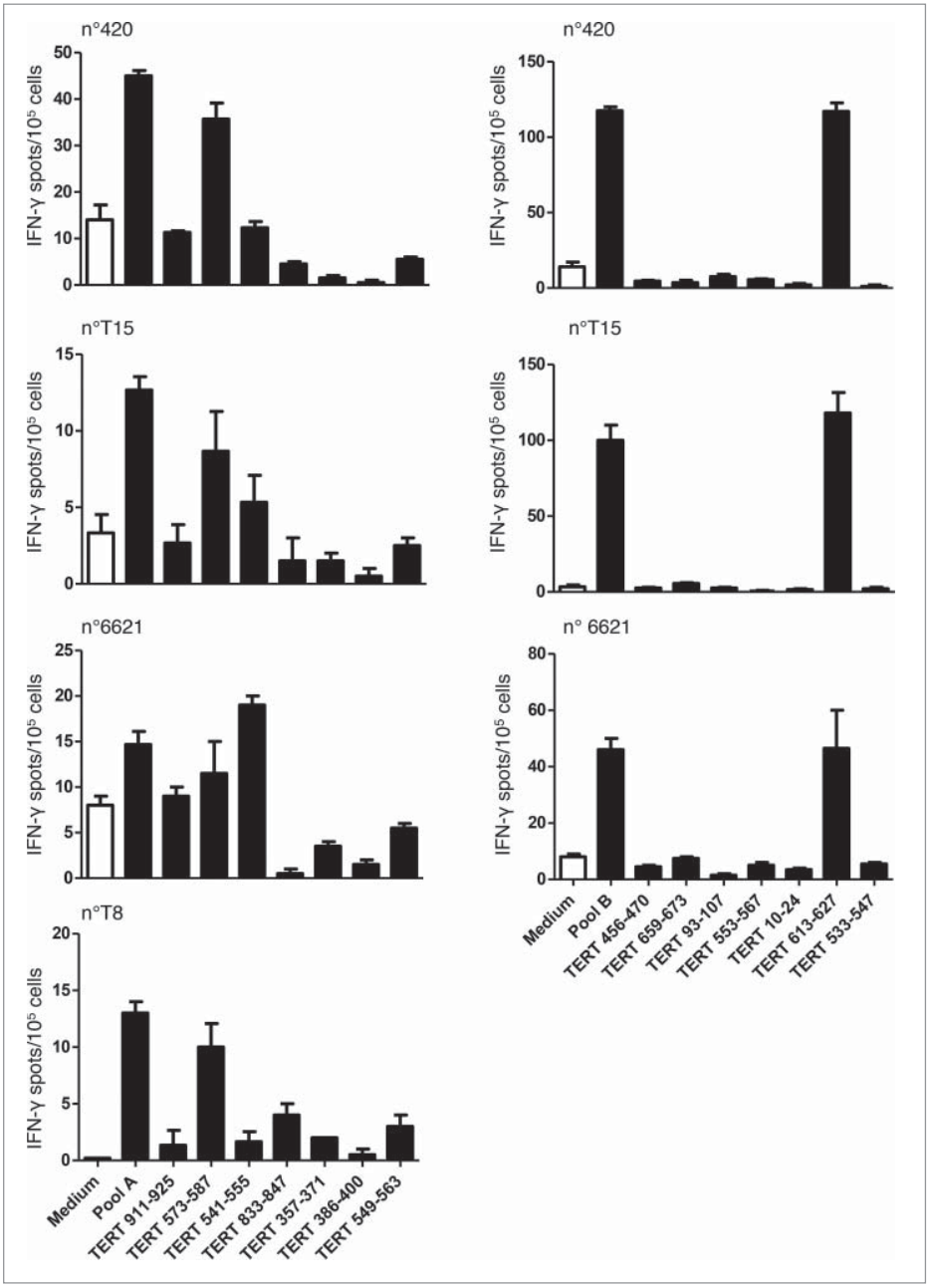


Figure 1. Immunogenicity of HLA-DP4-restricted TERT peptides in healthy donors. PBMC from nine healthy donors were stimulated *in vitro* with the mixture of HLA-DP4-restricted TERT peptides from pool A or pool B and the specificity of T cell were assessed by IFNγ ELISPOT. Responses against the mixture of the seven good binders TERT peptides (pool A) and individual peptides are shown for four donors out of five tested (left panel). Responses against the mixture and the individual peptides from pool B, defined as moderate binders by the prediction score, are shown for three donors out of four tested (right panel). Columns, mean of spots from triplicate wells per 10^5 cells; bars, SEM.

binders), only the $TERT_{613-627}$ peptide stimulated specific T cell responses but in three out of four healthy donors. We also derived T cell lines by 3 weekly rounds of *in vitro* stimulation of $CD4^+$ T cells collected from five HLA-DP4 healthy donors and co-cultured with autologous DC loaded with peptide pools. To confirm the HLA-DP4 restriction, IFNγ ELISPOT assay was performed with HLA-DP4 transfected L cells as antigen presenting cells (Fig. 2). Four T cell lines isolated from donors 214 and 215 (Fig. 2, left panel) reacted to $TERT_{541-555}$. One T cell line retrieved from donor 247 (247.39) was specific to $TERT_{911-925}$ while two T cell lines generated from donor 298 were specific to peptide $TERT_{613-627}$ (Fig. 2, right panel). At least for these three peptides, we demonstrated their presentation to T cells on HLA-DP4. Together, these results imply that precursor $CD4^+$ T cells against these HLA-DP4-restricted peptides from TERT are present in the peripheral human T-cell repertoire.

The TERT-derived peptides are endogenously processed in HLA-DP4 transgenic mice

Then, we studied the processing of these peptides in HLA-A2/HLA-DP4 transgenic mice[41] (Fig. S1). Besides the lack of endogenous mouse MHC class I and II molecules, these mice

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

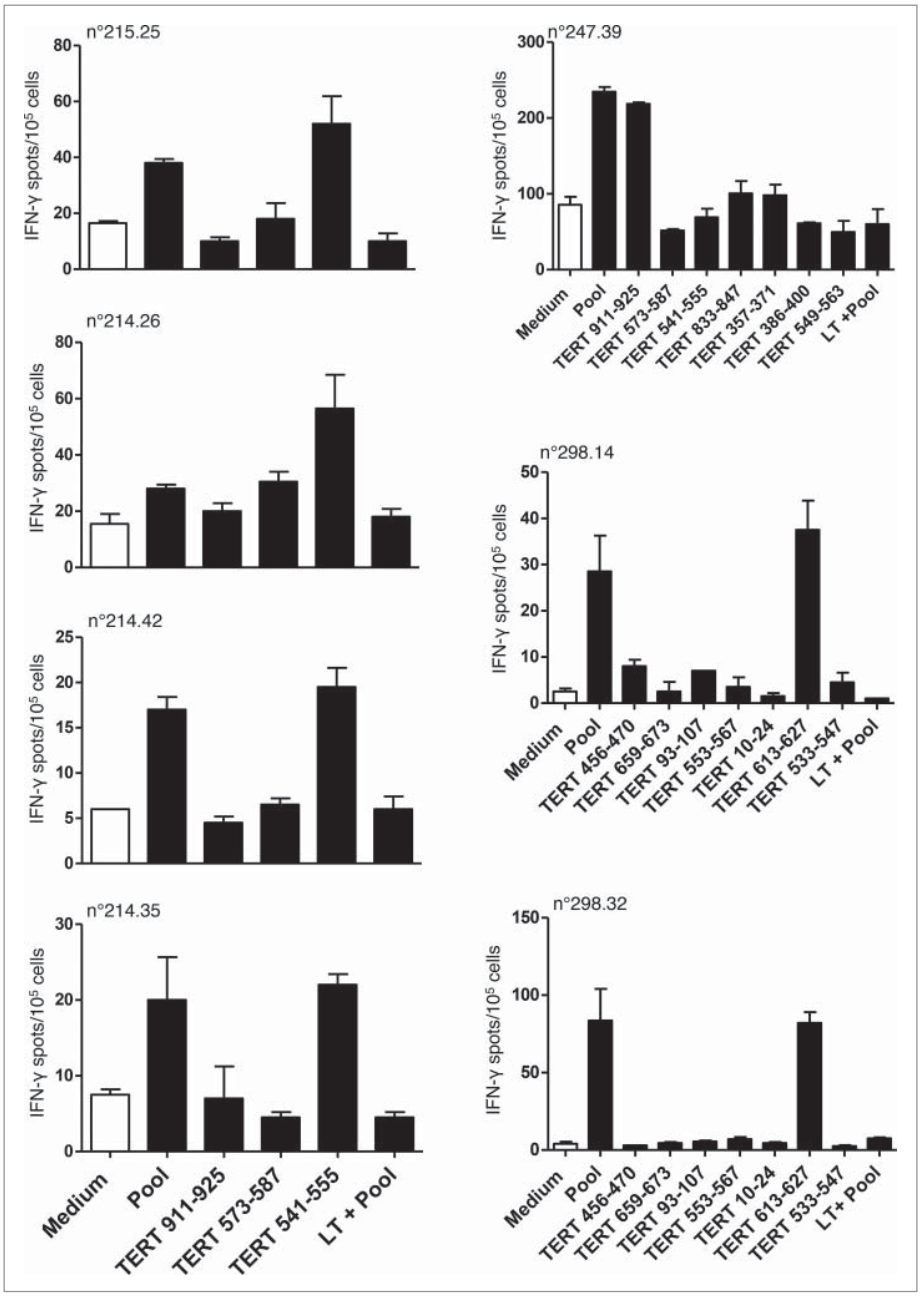


Figure 2. Specific T cell lines against TERT-derived HLA-DP4-binding peptides in healthy donors. Peptide-specific $CD4^+$ T cell lines were obtained after weekly stimulations by autologous mature DC loaded with the peptide mixture. T cell lines (5×10^3/well) were submitted to IFNγ ELISPOT assay. They were incubated with L-DP4 cells (3×10^4/well), with the peptide mixture (pool) or with each peptide. In control wells, L-DP4 cells were omitted and only peptide mixture and T cell were added without prior $CD4^+$ T cell sorting and peptide stimulation: LT+ pool. Columns, mean of spots from triplicate wells; bars, SEM.

express human $CD4^+$ co-receptor on $CD4^+$ T cells that ensure a better interaction with the HLA-DP4 molecules and were successfully used to evaluate the immunogenicity of HLA-DP4-restricted epitopes.[40] Mice were immunized with a plasmid DNA encoding the full-length human TERT and the specific $CD4^+$ T cell responses were monitored by proliferation assay (as detailed in supplementary materials and methods). We showed that T cell proliferation was induced by *in vitro* stimulation with the HLA-DP4 restricted TERT peptides, $TERT_{911-925}$, $TERT_{541-555}$, $TERT_{573-587}$ and $TERT_{613-627}$ (Figs. S1A and B). The absence of T cell proliferation observed in presence of non-pulsed DC ruled out the recognition of a shared epitope derived from mouse TERT. Like in human, the T cells specific to HLA-DP4 strong binder peptides also produce a high amount of IFNγ suggesting their Th1 polarization (Fig. S1C). Altogether, these results indicated that all the four peptides are endogenously processed from TERT and presented to $CD4^+$ T cells in an HLA-DP4 restricted manner.

Naturally occurring HLA-DP4-restricted $CD4^+$ Th1 responses against TERT are detected in several cancers

We further evaluated spontaneous immune response against TERT-derived peptides in patients with various cancers before

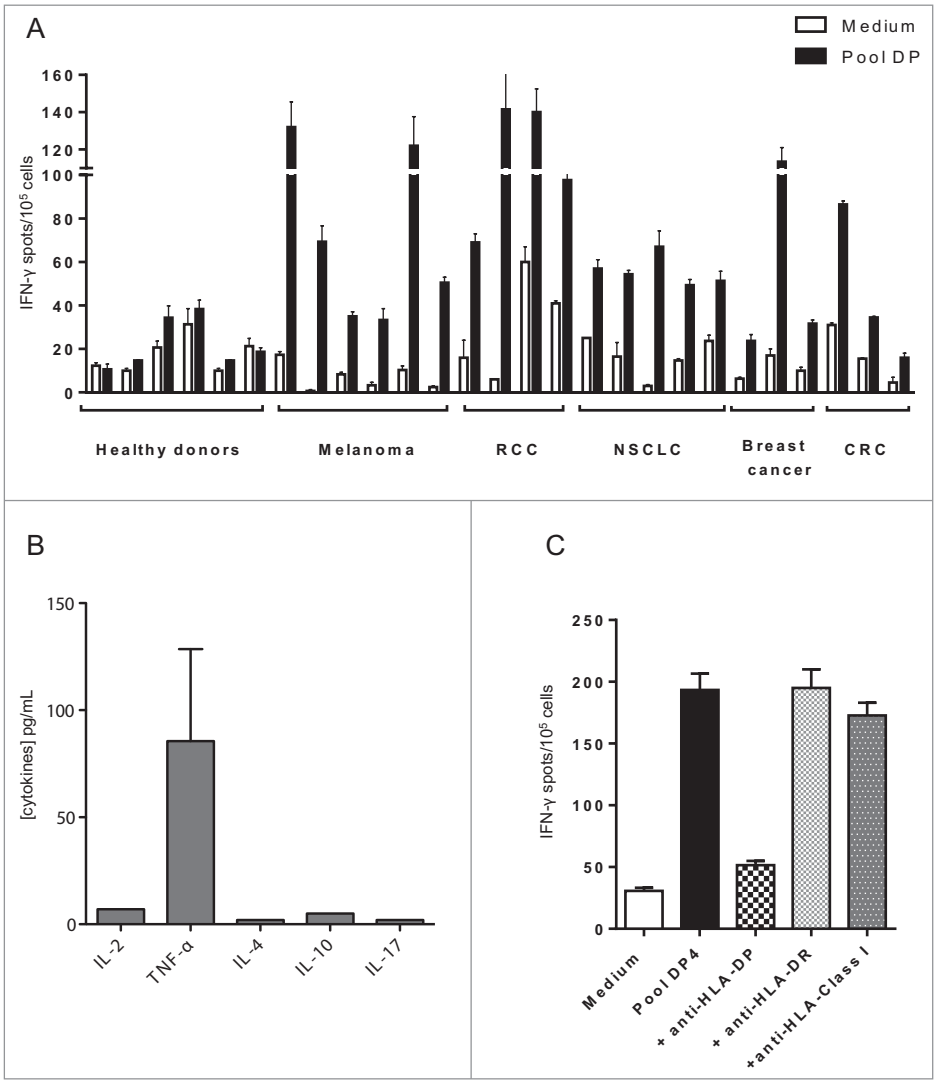


Figure 3. Spontaneous immune responses against HLA-DP4-binding peptides in cancer patients. PBMC were cultured during 8 days with a mixture of the four HLA-DP4-binding peptides (5 μg/mL) and the T cells reactivity against the peptide mixture was detected by IFNγ ELISPOT assay as described in material and methods. (A) Representative data from six healthy donors and 21 responding patients among melanoma (8/30 responders), renal cell carcinoma (RCC) (7/22 responders) non-small cell lung cancer (NSCLC, 8/87 responders), breast cancer (4/14 responders) and colorectal cancer (10/29 responders) are shown. Columns represent the mean of triplicate of IFNγ spots; bars, SEM. (B) Cytokines were measured in the supernatant of T cell culture from ELISPOT positive patients (n = 8) by Diaplex assay. Columns: mean of cytokine levels; bars, SEM. (C) HLA-DP restriction analysis by ELISPOT assay in presence of HLA-DP (B7/21), HLA-DR (L243) or HLA-class I (W6/32) blocking antibodies. Representative data from one responding patient after short-term peptide stimulation is shown.

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

any treatment or in healthy volunteers as controls. To this end, IFNγ ELISPOT assay was performed after a short term *in vitro* stimulation of blood lymphocytes with the mixture of the four peptides, named $TERT_{541-555}$, $TERT_{573-587}$, $TERT_{911-925}$ and $TERT_{613-627}$. In contrast to healthy donors, significant numbers of T cell responses against the HLA-DP4-binding peptides were detected in cancer patients such as melanoma, renal cell carcinoma, lung, breast, and colorectal cancers patients (Representative immune responders from various cancer cohorts are shown in Fig. 3A). In addition to IFNγ production, the analysis of a panel of cytokines in the supernatant of T cell cultures from responding patients showed high production of TNF-α but no production of IL-4, IL-17, and IL-10 supporting a Th1 polarization (Fig. 3B). No specific cytokines production was detected in the supernatants of T cell cultures from non-responding patients (data not shown). The HLA-DP restriction of the responses was assessed by using anti-HLA class II and class I blocking antibodies (Fig. 3C). We showed that the specific IFNγ production by T cells was abrogated in presence of a pan-HLA-DP blocking antibody but not in presence of an anti-HLA-DR blocking antibody or a pan anti-HLA class I antibody (Fig. 3C). To confirm that the spontaneous immune responses measured by IFNγ ELISPOT assay are mediated by $CD4^+$ T cells, we also performed intracellular IFNγ staining assay (ICS) and showed that only CD4+ T cells are responsible of the immune responses (Fig. S2).

Immunogenicity of each peptide was further analyzed separately by stimulating T cells from responding cancer patients in IFNγ ELISPOT assay. As depicted in Fig. 4A, we found spontaneous $CD4^+$ T cell responses against all the four HLA-DP4-restricted peptides. The frequency and magnitude of spontaneous T cell responses against $TERT_{541-555}$ or $TERT_{573-587}$ were significantly higher than those specific to $TERT_{613-627}$ or $TERT_{911-925}$ (Figs. 4A

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

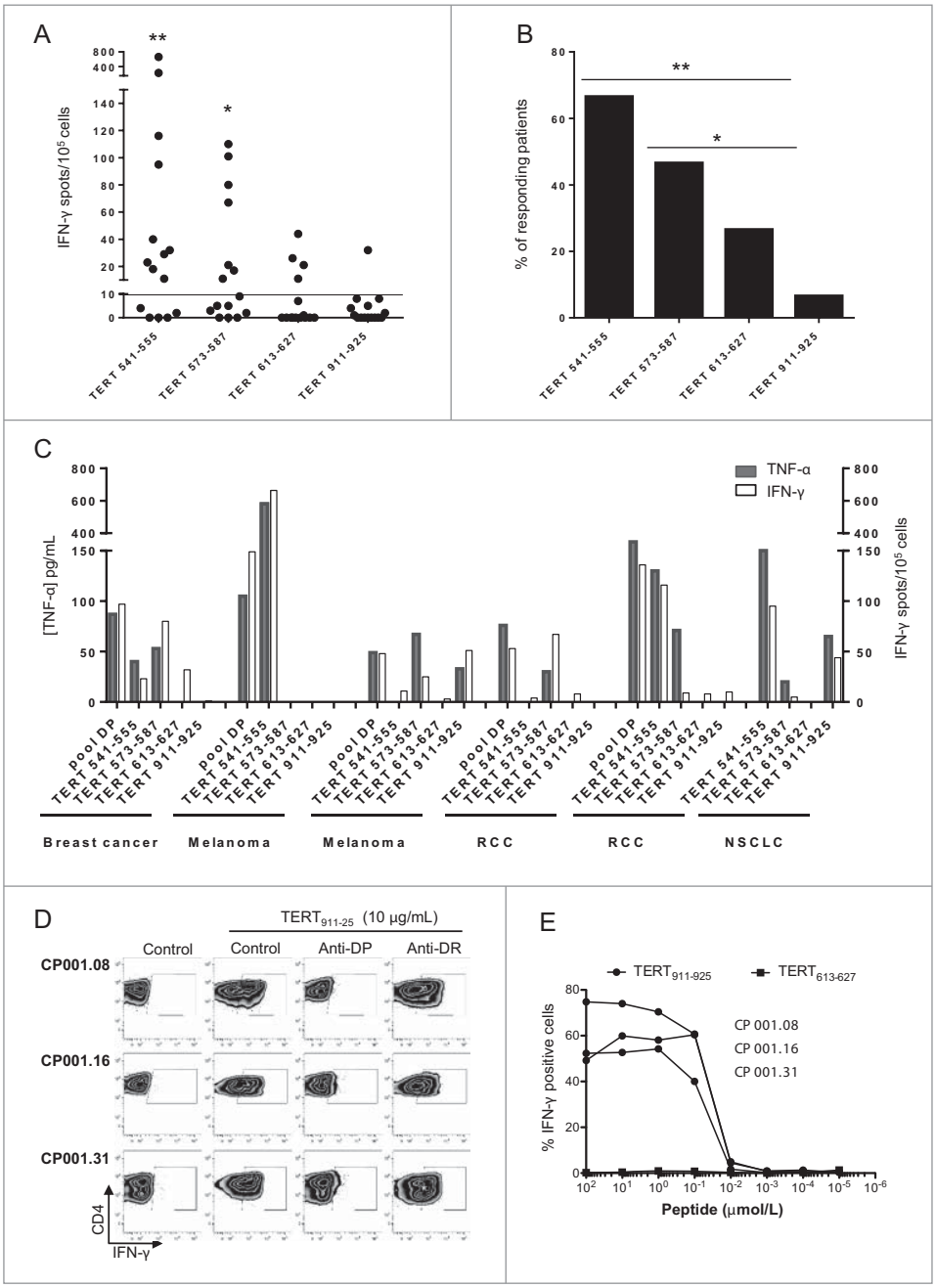


Figure 4. Characteristic of HLA-DP-restricted spontaneous T cells against TERT. PBMC from various cancer patients were stimulated one week with the mixture of HLA-DP4-restricted peptides as above. The peptide-specific T-cell responses were detected by IFNγ ELISPOT in presence of a single peptide. (A) Results represent specific IFNγ spots from 15 representative patients after subtraction of background. (B) Frequency of peptide-specific T-cell responses in cancer patients (n = 15). (C) Polarization of peptides-specific T cell responses, detection of cytokine production by DIAplex assay in supernatant after 15 h of culture in presence of HLA-DP4-restricted peptides. (D) HLA-DP restriction of $TERT_{911-925}$-specific $CD4^+$ T-cell clones was assessed by ICS in presence of anti-HLA-DP antibody (B7/21) or anti-HLA-DR antibody (L243). Percentage of IFNγ producing T-cell clones was shown. (E) The functional avidity of the $CD4^+$ T-cell clones was evaluated after stimulation with a range of the indicated increasing peptide concentrations ($TERT_{911-925}$ or, $TERT_{613-627}$ as irrelevant peptide). IFNγ secretion was assessed 12 h later by ICS.

and B). Like in healthy donors, $TERT_{541-555}$ and $TERT_{573-587}$ peptides appeared more immunogenic in cancer patients. We showed the ability of naturally occurring $CD4^+$ T cells against these 4 peptides to produce both IFNγ and TNF-α in several cancers revealing a polyfunctional capacity (Fig. 4C). The multi-cytokines analysis also confirmed the absence of Th2 and Th17-associated cytokines production by each peptide-specific $CD4^+$ T cell supporting their Th1 polarization (data not shown). In addition, immune responses against multiple HLA-DP4-binding peptides were detected in responding patients and they were mostly directed against $TERT_{541-555}$ and $TERT_{573-587}$ peptides regardless the tumor type (Fig. 4C).

Next, we isolated three $CD4^+$ T cell clones specific to $TERT_{911-925}$ from one responding HLA-DPB1*0401$^+$ lung cancer patient referred as CP001.08, CP001.16 and CP001.31 (Figs. 4D and E). The recognition of the cognate peptide by these clones was totally inhibited in presence of pan-HLA-DP

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

blocking antibody showing their HLA-DP4 restriction (Fig. 4D). The clonality of these three $CD4^+$ T cell clones was assessed by spectratyping analysis and revealed that they share the same clonotype (Fig. S3). These clones also exhibited high TCR avidity as they were still reactive at very low peptide concentration (EC50 $< 5 \times 10^{-2}$ μmol/L; Fig. 4E). Furthermore the CP001.31 clone recognized autologous DC loaded with recombinant hTERT protein in a HLA-DP-restriction manner supporting that the $TERT_{911-925}$ epitope is endogenously processed (Fig. S4). Collectively, we showed that these novels HLA-DP4-binding peptides sustain spontaneous CD4+ Th1 responses against TERT in several cancers.

Immunoprevalence and magnitude of spontaneous anti-TERT $CD4^+$ Th1 responses restricted by HLA-DP4 vs. HLA-DR

To address the question of the immunoprevalence (frequency of responders), we compared the frequency of anti-TERT $CD4^+$ T cell responses restricted by HLA-DP4 or HLA-DR in a cohort of 87 advanced lung cancer patients. The monitoring of TERT-specific $CD4^+$ T cell responses was performed before any treatment by IFNγ ELISPOT assay after short-term stimulation with the mixture of TERT-derived peptides restricted either by HLA-DP4 or HLA-DR molecules. The promiscuous HLA-DR-binding TERT-derived peptides (UCP) were previously used to monitor spontaneous anti-TERT $CD4^+$ Th1 responses in several cancers.[19,34] As shown in Fig. 5A, spontaneous anti-TERT $CD4^+$ T cell responses were detected in 10% (8/79) of patients whose T cells were reactive against HLA-DP4-restricted peptides as compared to 25% (22/87) after HLA-DR/UCP stimulation ($p = 0.01$). Similar high prevalence of HLA-DR restricted anti-TERT $CD4^+$ T cell responses was found in melanoma, breast cancer and renal cell carcinoma patients (data not shown). The HLA-DP4 genotyping in the lung cancer cohort (n = 29 patients) showed a frequency of 69% regardless the T cell reactivity against the HLA-DP4-restricted peptides. Fourteen out of these twenty-nine patients presented specific $CD4^+$ T cell responses against the HLA-DP4-binding peptides. Among them, 10 patients are HLA-DP4 positive (71%) and 4 patients are HLA-DP4 negative (28%). Then, the HLA-DP genotyping of these patients revealed that they are HLA-DP*02 positive (Table S1) suggesting that other HLA-DP alleles are able to present these epitopes.

We also found that the magnitude of the HLA-DR-restricted immune response was significantly stronger than HLA-DP-restricted response (102+/−22 versus 37+/−7 mean+/− SEM number of specific IFNγ spots/10^5 cells respectively $p = 0.005$) (Fig. 5B). The frequency and intensity of recall antivirus T cell responses measured at the same time in patients by IFNγ ELISPOT assay was similar regardless of the HLA class II genotype (Fig. 5C). In patients without TERT-specific immune response, no other Th1, Th2 or Th17 cytokines production was detected in the supernatant of T cell cultured with HLA-DP4 or HLA-DR-binding peptides (data not shown). This ruled out the possible induction of TERT-specific immune response undetected by IFNγ ELISPOT assay. Furthermore, in lung cancer patients who presented both spontaneous HLA-DR and HLA-DP-restricted TERT-specific $CD4^+$ T cell responses, the magnitude of HLA-DR-restricted Th1 responses was also two to three times higher than HLA-DP4 ones in four out the six patients (Fig. 5D). This result was confirmed in other cancers (Fig. 5E). Collectively, these results showed that the HLA-DR locus sustained more prevalent and robust spontaneous $CD4^+$ T cell responses against TERT than HLA-DP4 allotype in several human cancers.

Discussion

In this study, we characterized the HLA-DP4-restricted-$CD4^+$ T cell responses against TERT in various cancer patients. We identified four immunogenic HLA-DP4-binding peptides derived from TERT named $TERT_{541-555}$, $TERT_{573-587}$, $TERT_{613-627}$ and $TERT_{911-925}$. Unlike in healthy subjects, naturally occurring $CD4^+$ T cell responses against these epitopes were detected in peripheral blood of patients from several cancer types. The spontaneous HLA-DP-restricted anti-TERT $CD4^+$ T cells detected in cancer patients mainly produced IFNγ and TNF-α indicating their Th1 polarization. Nonetheless, differences in the peptide immunogenicity were observed at the individual setting. We found that spontaneous responses are more frequently specific to $TERT_{541-555}$ and $TERT_{573-587}$ peptides than $TERT_{613-627}$ and $TERT_{911-925}$ peptides. The $TERT_{613-627}$ peptide extensively overlaps the HLA-DP4-binding peptide $TERT_{611-626}$ known as GV1001 which induces specific $CD4^+$ T cell responses after therapeutic vaccination.[42,43] However, in absence of experiments with minimal peptide length from $TERT_{613-627}$ peptide involved in HLA-DP-restricted responses, we could not conclude that this epitope differs from the GV1001 peptide.

A high immunoprevalence of MHC class II epitopes may result from their capacity to bind the prevalent MHC class II molecule HLA-DP4 or from their promiscuous binding affinity for HLA-DR molecules.[39] Results from previous studies reported that HLA-DR molecules were more frequently involved in $CD4^+$ T cell stimulation against tumor antigens such as survivin and NY-ESO-1 than HLA-DP4 molecules.[7,36-38] However, this question was mainly addressed in healthy individuals and in a low number of patients. Here, we have extensively studied the immunogenicity of HLA-DP4 vs. HLA-DR-restricted tumor-specific $CD4^+$ T cell responses by using TERT as relevant tumor antigen. As a correlation between the binding capacity and the immunogenicity of T cell epitopes has already been described,[44] we used equal number of peptides (four peptides/allele) with equivalent binding affinity to their respective HLA class II molecules to monitor TERT-specific $CD4^+$ Th1 immune responses. We have shown in a cohort of NSCLC patients that spontaneous anti-TERT $CD4^+$ Th1 responses are two times more frequent in HLA-DR (25%) than in HLA-DP4 context (10%). Similar results were found in other cancers such as melanoma, breast cancer, renal cell carcinoma and colorectal cancer (data not shown). This supports the high immunoprevalence of HLA-DR-restricted $CD4^+$ T cell response against telomerase. Although HLA-DP4 genotyping was not performed in all cancer patients cohort, the HLA-DP4 frequency observed in the lung cancer is 69%. Although this frequency is slightly lower than expected (75%) this could not explain the lower immunoprevalence of HLA-DP-restricted responses. However, we found that around

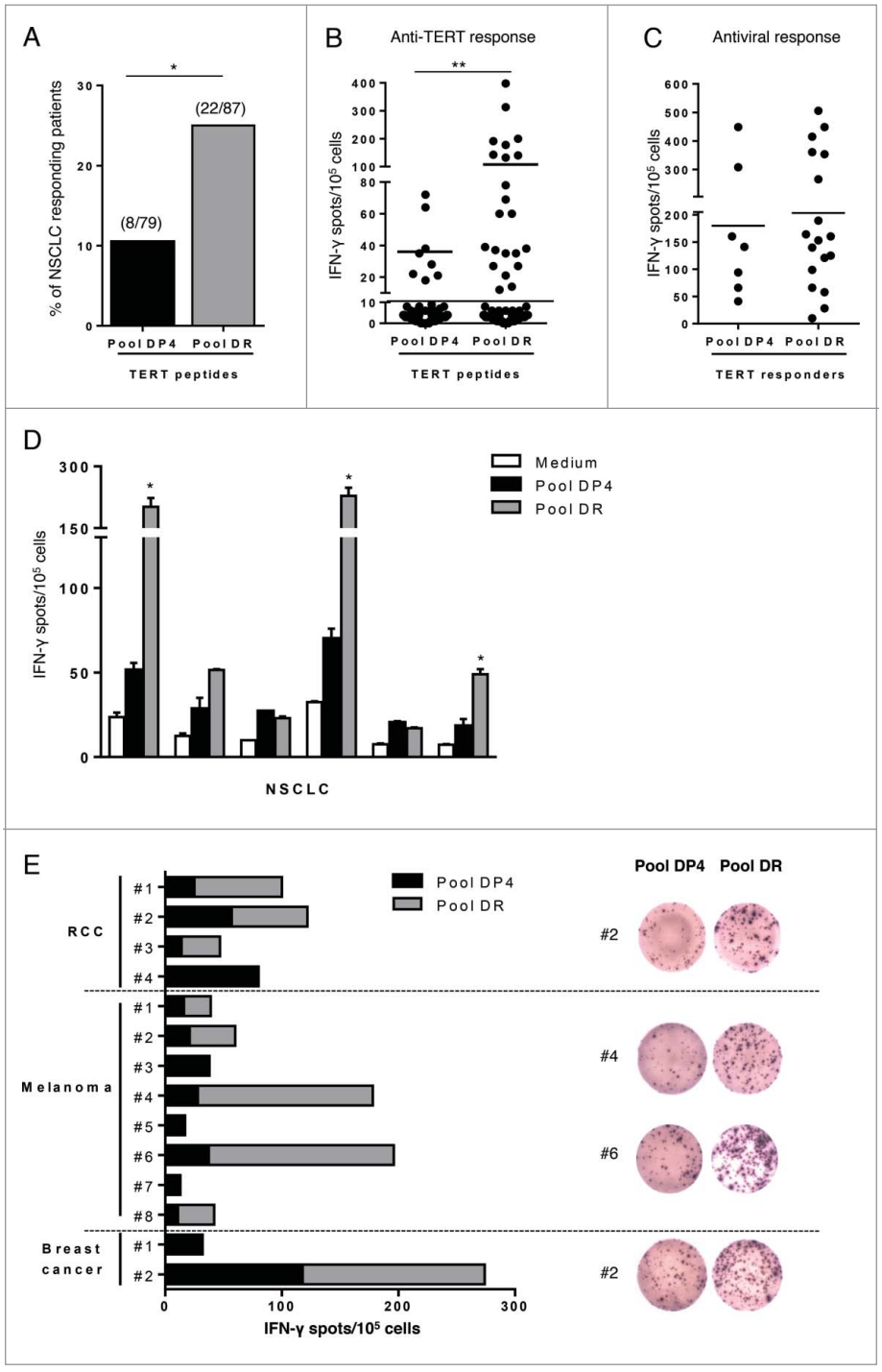


Figure 5. Comparative analysis of HLA-DP versus HLA-DR-restricted T cell responses against TERT in cancer patients. PBMC were cultured either with a mixture of HLA-DP4 TERT peptides, or UCP (HLA-DR^{+}). Cells cultured in presence of pool of peptides derived from Flu, EBV, CMV virus were used as control. The presence of antigen-specific T cells was detected using IFNγ ELISPOT assay. (A) Frequency of spontaneous HLA-DP4 (8/79) vs. HLA-DR (22/87)-restricted T cell responses against TERT in lung cancer patients, $p = 0.01$. (B) Magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted T cell responses against TERT in lung cancer, $p = 0.0054$. (C) HLA-DR vs. HLA-DP4 antiviral T cell responses in lung cancer responding patients. (D) Responses against both HLA-DP4 and HLA-DR restricted peptides in six representative lung cancer patients. (E) Responses against both HLA-DP4 and HLA-DR restricted peptides in 14 patients with various cancers (n = 2 breast cancer, n = 4 renal cell carcinoma RCC, and n = 8 melanoma). Left, histograms represented specific IFNγ spots number after subtraction of background. Right, illustration of HLA-DP4 and HLA-DR ELISPOT wells.

28% of HLA-DP-restricted immune responders are HLA-DP4 negative suggesting that other HLA-DP molecules could present these peptides. Accordingly, binding peptide prediction showed that these HLA-DP4-binding peptides from TERT could be presented on several HLA-DP molecules (not shown).

Typically, it has been reported that tumor antigen-derived peptides which bind to HLA-DP4 are often promiscuous.[45] For example, HLA-DP4-restricted peptides derived from NY-ES0–1 and MAGE-A3, have been shown to bind to multiple HLA-DR molecules.[36,46] Epitope prediction revealed that these

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

novel TERT-derived HLA-DP4 peptides were low HLA-DR binders but efficiently bind to others HLA-DP alleles. In contrast, the TERT-derived HLA-DR-restricted peptides (UCP) were not predicted to bind HLA-DP4 molecules (data not shown). As a result, the low immunoprevalence of HLA-DP4 versus HLA-DR- restricted responses could not be related to a particular promiscuity of the UCP. We also found that the magnitude of the HLA-DR-restricted TERT-specific $CD4^+$ T cell responses was higher than HLA-DP-restricted ones in cancer patients. Interestingly, in patients who had both MHC class II-restricted responses, the HLA-DR-restricted responses were commonly stronger than HLA-DP-restricted ones. The frequency and quality of antiviral T cell responses measured simultaneously in patients were similar in both HLA-DP and HLA-DR responding patients indicating that the difference observed could not be explained by a preferential T cell anergy of HLA-DP4 responding patients. As previously described, the HLA-DRB1 locus is called high expression locus because its product is abundant on the cell surface. In contrast HLA-DP locus, which product is expressed at low levels, may be categorized as low expression locus.[47,48] Consequently, in hematopoietic stem cells transplantation setting, HLA loci A, B, C and DRB1 are commonly used to select compatible unrelated donor, while HLA-DP allotypes are not considered.[49] Thus, we speculated that the higher immunogenicity of HLA-DR-binding peptides could be explained by the higher expression of HLA-DR molecules on antigen presenting cells. We previously reported in NSCLC that patients with spontaneous HLA-DR-restricted anti-TERT Th1 response achieved a better survival when responded to chemotherapy.[19] Hence, it would be interesting to evaluate the prognosis value of HLA-DP vs. HLA-DR-restricted TERT-specific $CD4^+$ T cell responses in cancer patients.

In conclusion, we strictly demonstrated for the first time in a large cohort of cancer patients the immunoprevalence and immunodominance of anti-TERT $CD4^+$ T cell responses against HLA-DR-binding peptides compared to HLA-DP4 ones. These results highlight the interest to consider the hierarchy of HLA class II-restriction for $CD4^+$ T-cell-based antitumor immunotherapy and for the design of novel immunomonitoring tools.

Materials and methods

Patients and healthy donors

Non-small cell lung cancer patients (NSCLC) (n = 87) were involved at the University Hospital of Besançon (France) in the Telocap cohort, a prospective study on anti-telomerase immune responses in lung cancer. The other cancer patients were recruited from the department of oncology and dermatology of the University Hospital of Besançon. All patients were enrolled after the signature of informed consent, in accordance with the French regulation and after approval by the local and national ethics committee. Blood was collected before any cancer specific treatment. For healthy donors, blood cells were collected from anonymous donors at the Etablissement Français du Sang (EFS, Besançon, France) as apheresis kit preparation after the signature of the informed consent and following the EFS guidelines.

Synthetic peptides

Overlapping peptides and biotinylated peptides were synthesized using standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry on an Advanced ChemTech Apex synthesizer (Advanced ChemTech Europe) and cleaved from the resin by 95% trifluoroacetic acid. If necessary, peptides were purified by reversed phase-HPLC on a C18 Vydac column (Interchim). All synthetic peptides (>80 % purity) were purchased from ProImmune. The four promiscuous HLA-DR peptides derived from TERT called universal cancer peptides (UCP) UCP1 (PAAFRALVAQCLVCV), UCP2 (KSVWSKLQSIGIRQH), UCP3 (GTAFVQMPAHGLFPW) and UCP4 (SLCYSILKAKNAGMS) have been described previously [19] and have been purchased from ProImmune (at > 80% purity).

HLA-DP4-specific binding assay

The binding to DPB1*0401 and DPB1*0402 molecules was assessed by competitive ELISA as previously reported.[7] Briefly, experiments were performed in 10 mM phosphate, 150 mM NaCL, 1 mM n-dodecyl b-D-maltoside, 10 mM citrate, and 0.003% thimerosal (pH 5) buffer with 10 mM of Oxy271–287 peptide, an appropriate dilution of HLA-DP4 molecules, and serial mid-dilutions of competitor peptides. After 24 h incubation at 37°C, samples were neutralized and applied to B7/21-coated plates for 2 h. Bound biotinylated peptide was detected by means of streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (GE Healthcare) and 4-methylumbelliferyl phosphate substrate (Sigma-Aldrich). Emitted fluorescence was measured at 450 nm upon excitation at 365 nm in a victor II spectrofluorometer (PerkinElmer Instruments). Data were expressed as the peptide concentration that prevented binding of 50% of the labeled peptide (IC50). IC50 values of the Oxy271–287 peptide for HLA-DP401 and HLA-DP402 were 6 nM and 4 nM, respectively.

In vitro immunogenicity of peptides in healthy donors

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Sigma-Aldrich) and plated at 4×10^6 cells per well in a 24-wells plate in RPMI 5% human serum with 10 mmol/L of pool of TERT peptides from pool A and B. Recombinant interleukins, IL-7 (5 ng/mL; Peprotech, 200–07), and IL-2 (20 UI/mL; Novartis) were added at days 1 and 3, respectively. At days 7 and 14, cells were stimulated with γ-irradiated autologous PBMCs pulsed with of UCPs (10 mmol/L) and IL-2 (20 UI/mL) was added at days 8 and 15 as previously reported.[7,19] At day 21, the T cell specificity was investigated by IFNγ ELISPOT (Diaclone, 856 051 020P).

Generation of peptide-specific $CD4^+$ T cell lines from healthy donors

Monocyte-derived dendritic cells (moDC) were generated from plastic-adherent cells of PBMC as described previously.[7] $CD4^+$ T lymphocytes were isolated by positive selection using magnetic microbeads (human $CD4^+$ isolation Kit Miltenyi Biotec,

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

130-045-101), as recommended by the manufacturer. Mature DC (5×10^5) were incubated for 4 h in 1 mL complete IMDM medium containing a mixture of TERT peptides, with each peptide being at a concentration of 10 μg/mL. The $CD4^+$ T lymphocytes were restimulated on days 7, 14, and 21 with autologous DC freshly loaded with the TERT peptides in complete IMDM medium supplemented with 10 UI/mL IL-2 (Novartis) and 5 ng/mL IL-7 (Peprotech). Specificity of the T cell lines was tested by IFNγ ELISPOT assays at days 28 using HLA-DP4 transfected L cells as described previously.[19]

Assessment of spontaneous antigen-specific T-cell responses in cancer patients

Spontaneous responses were assessed by IFNγ ELISPOT after a short-term *in vitro* stimulation of PBMC with the mixture of the four selected peptides (5 μg/mL) during 7 days as previously described. A peptide mixture derived from virus influenza (Flu), Epstein barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) was used to evaluate antiviral recall response (CTL, PA-CEF-001). The presence of peptide-specific T cells was measured by IFNγ ELISPOT assay as detailed above.[19,34]

Isolation and functional analysis of $CD4^+$ T cell clones

HLA-DP4 restricted TERT peptide reactive T cells were isolated by IFNγ T cell sorting according to manufacturer's instruction (Miltenyi Biotec, 130-054-201). Specific $CD4^+$ T cell clones were generated by IFNγ limiting dilution and amplified after stimulation with PHA in presence of irradiated allogenic PBMCs, EBV-transformed cell-lines according to the previously described procedure.[19] Functional analysis of $CD4^+$ T cell clones was performed by using intracytoplasmic IFNγ staining (ICS). Briefly, after a 12-h stimulation period with or without 10 μg/mL peptide, T cells were labeled with anti-$CD4^+$ (Diaclone, 954.031.010), anti-IFNγ (BD Biosciences, 554702) using Cytofix/CytoPerm KIT (BD Biosciences, 554714). To determine HLA restriction, $CD4^+$ T cell clones were treated with 10 μg/mL of anti-HLA-DP antibody (B7/21) (Leinco, H260) or anti-HLA-DR antibody (L243) (BD Biosciences, 555809) for 1 h before the addition of peptide.

ELISPOT and DIAplex assays

IFNγ ELISPOT was conducted as previously described.[19] Briefly, cells (10^5 per well) were cultured in triplicates in ELISPOT plate with HLA-DP4 restricted peptides (mixture or individual at 5 μg/mL in X-vivo 15 medium, Ozyme, BE04–418) for 15 h. The IFNγ spots were revealed following the manufacturer's instructions (Diaclone, 856 051 020P). Spot-forming cells were counted using the C.T.L. Immunospot system (Cellular Technology Ltd). The number of specific T cells expressed as spot-forming cells per 10^5 cells was calculated after subtracting negative control values (background). Responses were positive when IFNγ spots were more than 10 and more than two times the background. In some experiments, a panel of cytokines production analysis was measured using DIAplex Human Th1/Th2/Th17 kit (Diaclone, 880.100.010) in the supernatant of lymphocyte culture according to the manufacturer's instructions. To determine HLA restriction, PBMC were treated with 10 μg/mL of anti-HLA-DP antibody (B7/21) (Leinco, H260) or anti-HLA-class I antibody (hybridoma supernatant from clone W6/32) for 1 h before the addition of peptide.

Statistics

Statistical differences between $CD4^+$ T cell responses were calculated using Mann–Whitney or Student t test using Prism 4 GraphPad Software. p values less than 0.05 were considered significant ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$).

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors also thank all medical doctors for the recruitment of patients at medical Oncology department, chest disease and thoracic oncology, and dermatology department of the University Hospital of Besançon. The authors thank Dr. Lone Yu Chun for providing the HLA-A2.1$^{+/+}$ HLA-DP4$^{+/+}$ hCD4$^{+/+}$ transgenic mice. The authors thank the Biomonitoring platform of CIC-1431 for their technical support.

Funding

This work was supported by grants from the French National Institute of Cancer (INCA), la Ligue contre le cancer, the Conseil Régional de Franche-Comté.

References

1. Kim H-J, Cantor H. CD4+ T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. Cancer Immunol Res 2014; 2:91-8; PMID:24778273; http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0216
2. Disis ML, Watt WC, Cecil DL. Th1 epitope selection for clinically effective cancer vaccines. Oncoimmunology 2014; 3:e954971; PMID:25941610; http://dx.doi.org/10.4161/21624011.2014.954971
3. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. Immunol Rev 2008; 222:129-44; PMID:18363998; http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x
4. Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, Scott B. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. J Immunol 2000; 165:6047-55; PMID:11086036; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6047
5. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of $CD8^+$ T lymphocytes. Cancer Res 2010; 70:8368-77; PMID:20940398; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1322
6. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 2006; 313:1960-4; PMID:17008531; http://dx.doi.org/10.1126/science.1129139
7. Wang X-F, Kerzerho J, Adotevi O, Nuyttens H, Badoual C, Munier G, Oudard S, Tu S, Tartour E, Maillère B. Comprehensive analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-restricted CD4+ T cell response specific for the tumor-shared antigen survivin in healthy donors and cancer patients. J Immunol 2008; 181:431-9; PMID:18566409; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.431
8. Tsuji T, Altorki NK, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S. Characterization of preexisting MAGE-A3-specific CD4+ T cells in cancer patients and

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

healthy individuals and their activation by protein vaccination. J Immunol 2009; 183:4800-8; PMID:19734225; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900903
9. Kudela P, Sun Z, Fourcade J, Janjic B, Kirkwood JM, Maillere B, Zarour HM. Epitope hierarchy of spontaneous CD4+ T cell responses to LAGE-1. J Immunol Baltim Md 1950 2011; 186:312-22; PMID:21131422; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1001989
10. Ayyoub M, Pignon P, Classe J-M, Odunsi K, Valmori D. CD4+ T effectors specific for the tumor antigen NY-ESO-1 are highly enriched at ovarian cancer sites and coexist with, but are distinct from, tumor-associated Treg. Cancer Immunol Res 2013; 1:303-8; PMID:24777968; http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0062-T
11. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer 2012; 12:298-306; PMID:22419253; http://dx.doi.org/10.1038/nrc3245
12. Widenmeyer M, Griesemann H, Stevanović S, Feyerabend S, Klein R, Attig S, Hennenlotter J, Wernet D, Kuprash DV, Sazykin AY et al. Promiscuous survivin peptide induces robust CD4+ T-cell responses in the majority of vaccinated cancer patients. Int J Cancer J Int Cancer 2012; 131:140-9; PMID:21858810; http://dx.doi.org/10.1002/ijc.26365
13. Aarntzen EHJG, De Vries IJM, Lesterhuis WJ, Schuurhuis D, Jacobs JFM, Bol K, Schreibelt G, Mus R, De Wilt JHW, Haanen JBAG et al. Targeting CD4(+) T-helper cells improves the induction of antitumor responses in dendritic cell-based vaccination. Cancer Res 2013; 73:19-29; PMID:23087058; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1127
14. Adotévi O, Dosset M, Galaine J, Beziaud L, Godet Y, Borg C. Targeting antitumor CD4 helper T cells with universal tumor-reactive helper peptides derived from telomerase for cancer vaccine. Hum Vaccines Immunother 2013; 9:1073-7; PMID:23357860; http://dx.doi.org/10.4161/hv.23587
15. Woods K, Cebon J. Tumor-specific T-cell help is associated with improved survival in melanoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 2013; 19:4021-3; PMID:23864163; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1349
16. Slingluff CL, Lee S, Zhao F, Chianese-Bullock KA, Olson WC, Butterfield LH, Whiteside TL, Leming PD, Kirkwood JM. A randomized phase II trial of multiepitope vaccination with melanoma peptides for cytotoxic T cells and helper T cells for patients with metastatic melanoma (E1602). Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 2013; 19:4228-38; PMID:23653149; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0002
17. Chen CI-U, Maecker HT, Lee PP. Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. Blood 2008; 111:5342-9; PMID:18326818; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-12-128397
18. Rakhra K, Bachireddy P, Zabuawala T, Zeiser R, Xu L, Kopelman A, Fan AC, Yang Q, Braunstein L, Crosby E et al. CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation. Cancer Cell 2010; 18:485-98; PMID:21035406; http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.002
19. Godet Y, Fabre E, Dosset M, Lamuraglia M, Levionnois E, Ravel P, Benhamouda N, Cazes A, Le Pimpec-Barthes F, Gaugler B et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 2012; 18:2943-53; PMID:22407833; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3185
20. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, Boegel S, Schrörs B, Vascotto F, Castle JC et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. Nature 2015; 520:692-6; PMID:25901682; http://dx.doi.org/10.1038/nature14426
21. Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, Verdegaal EME, Schotte R, Calis JJA, Behjati S, Velds A, Hilkmann H, Atmioui DE et al. High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. Nat Med 2015; 21:81-5; PMID:25531942; http://dx.doi.org/10.1038/nm.3773
22. Zanetti M. Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics. J Immunol 2015; 194:2049-56; PMID:25710958; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol
23. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144:646-74; PMID:21376230; http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013
24. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. Nat Rev Cancer 2008; 8:167-79; PMID:18256617; http://dx.doi.org/10.1038/nrc2275
25. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. Carcinogenesis 2010; 31:9-18; PMID:19887512; http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgp268
26. Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. Nat Rev Cancer 2011; 11:161-76; PMID:21346783; http://dx.doi.org/10.1038/nrc3025
27. Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. Cancer Lett 2003; 194:221-33; PMID:12757980; http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00709-7
28. Li Y, Tergaonkar V. Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies. Cancer Res 2014; 74:1639-44; PMID:24599132; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3568
29. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. Science 2013; 339:957-9; PMID:23348506; http://dx.doi.org/10.1126/science.1229259
30. Fredriksson NJ, Ny L, Nilsson JA, Larsson E. Systematic analysis of noncoding somatic mutations and gene expression alterations across 14 tumor types. Nat Genet 2014; 46:1258-63; PMID:25383969; http://dx.doi.org/10.1038/ng.3141
31. Borah S, Xi L, Zaug AJ, Powell NM, Dancik GM, Cohen SB, Costello JC, Theodorescu D, Cech TR. Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. Science 2015; 347:1006-10; PMID:25722414; http://dx.doi.org/10.1126/science.1260200
32. Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen S-Y. Identification of HLA DR7-restricted Epitopes from Human Telomerase Reverse Transcriptase Recognized by CD4+ T-Helper Cells. Cancer Res 2002; 62:2600-5; PMID:11980655
33. Schroers R, Shen L, Rollins L, Rooney CM, Slawin K, Sonderstrup G, Huang XF, Chen S-Y. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 2003; 9:4743-55; PMID:14581345
34. Dosset M, Godet Y, Vauchy C, Beziaud L, Lone YC, Sedlik C, Liard C, Levionnois E, Clerc B, Sandoval F et al. Universal cancer peptide-based therapeutic vaccine breaks tolerance against telomerase and eradicates established tumor. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 2012; 18:6284-95; PMID:23032748; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0896
35. Godet Y, Dosset M, Borg C, Adotevi O. Is preexisting antitumor CD4 T cell response indispensable for the chemotherapy induced immune regression of cancer? Oncoimmunology 2012; 1:1617-9; PMID:23264913; http://dx.doi.org/10.4161/onci.21513
36. Zarour HM, Maillere B, Brusic V, Coval K, Williams E, Pouvelle-Moratille S, Castelli F, Land S, Bennouna J, Logan T et al. NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells. Cancer Res 2002; 62:213-8; PMID:11782380; http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00501.x
37. Mandic M, Castelli F, Janjic B, Almunia C, Andrade P, Gillet D, Brusic V, Kirkwood JM, Maillere B, Zarour HM. One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4+ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. J Immunol Baltim Md 1950 2005; 174:1751-9; PMID:15661941; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1751
38. Gnjatic S, Atanackovic D, Jäger E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen Y-T et al. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:8862-7; PMID:12853579; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1133324100

39. Castelli FA, Buhot C, Sanson A, Zarour H, Pouvelle-Moratille S, Nonn C, Gahery-Ségard H, Guillet J-G, Ménez A, Georges B et al. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. J Immunol Baltim Md 1950 2002; 169:6928-34; PMID:12471126; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.6928
40. Busson M, Castelli FA, Wang X-F, Cohen WM, Charron D, Ménez A, Maillère B. Prediction of CD4(+) T cell epitopes restricted to HLA-DP4 molecules. J Immunol Methods 2006; 317:144-51; PMID:17107686; http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.002
41. Ru Z, Xiao W, Pajot A, Kou Z, Sun S, Maillere B, Zhao G, Ojcius DM, Lone Y-C, Zhou Y. Development of a humanized HLA-A2.1/DP4 transgenic mouse model and the use of this model to map HLA-DP4-restricted epitopes of HBV envelope protein. PloS One 2012; 7:e32247; PMID:22403638; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032247
42. Brunsvig PF, Kyte JA, Kersten C, Sundstrøm S, Møller M, Nyakas M, Hansen GL, Gaudernack G, Aamdal S. Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 2011; 17:6847-57; PMID:21918169; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1385
43. Inderberg-Suso E-M, Trachsel S, Lislerud K, Rasmussen A-M, Gaudernack G. Widespread CD4+ T-cell reactivity to novel hTERT epitopes following vaccination of cancer patients with a single hTERT peptide GV1001. Oncoimmunology 2012; 1:670-86; PMID: 22934259; http://dx.doi.org/10.4161/onci.20426
44. Sette A, Vitiello A, Reherman B, Fowler P, Nayersina R, Kast WM, Melief CJ, Oseroff C, Yuan L, Ruppert J et al. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. J Immunol 1994; 153:5586-92; PMID:7527444
45. Sidney J, Steen A, Moore C, Ngo S, Chung J, Peters B, Sette A. Five HLA-DP molecules frequently expressed in the worldwide human population share a common HLA supertypic binding specificity. J Immunol 2010; 184:2492-503; PMID:20139279; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903655
46. Consogno G, Manici S, Facchinetti V, Bachi A, Hammer J, Conti-Fine BM, Rugarli C, Traversari C, Protti MP. Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3. Blood 2003; 101:1038-44; PMID:12393675; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-03-0933
47. Nuñez G, Ball EJ, Myers LK, Stastny P. Allostimulating cells in man. Quantitative variation in the expression of HLA-DR and HLA-DQ molecules influences T-cell activation. Immunogenetics 1985; 22:85-91; PMID:3160658; http://dx.doi.org/10.1007/BF00430597
48. van Vreeswijk H, Ruiter DJ, Bröcker EB, Welvaart K, Ferrone S. Differential expression of HLA-DR, DQ, and DP antigens in primary and metastatic melanoma. J Invest Dermatol 1988; 90:755-60; PMID:3283252; http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12560951
49. Nagler A. HLA-DP1 matching: are we there yet? Blood 2014; 124:2476-7; PMID:25323686; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-09-599225

Downloaded by [Simon Fraser University] at 13:36 01 August 2016

OncoImmunology

Annexe 4

ISSN: (Print) 2162-402X (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/koni20

Circulating NKp46^{+} Natural Killer cells have a potential regulatory property and predict distinct survival in Non-Small Cell Lung Cancer

Emilie Picard, Yann Godet, Caroline Laheurte, Magalie Dosset, Jeanne Galaine, Laurent Beziaud, Romain Loyon, Laura Boullerot, Elodie Lauret Marie Joseph, Laurie Spehner, Marion Jacquin, Guillaume Eberst, Béatrice Gaugler, Françoise Le pimpec-Barthes, Elizabeth Fabre, Virginie Westeel, Anne Caignard, Christophe Borg & Olivier Adotévi

To cite this article: Emilie Picard, Yann Godet, Caroline Laheurte, Magalie Dosset, Jeanne Galaine, Laurent Beziaud, Romain Loyon, Laura Boullerot, Elodie Lauret Marie Joseph, Laurie Spehner, Marion Jacquin, Guillaume Eberst, Béatrice Gaugler, Françoise Le pimpec-Barthes, Elizabeth Fabre, Virginie Westeel, Anne Caignard, Christophe Borg & Olivier Adotévi (2018): Circulating NKp46^{+} Natural Killer cells have a potential regulatory property and predict distinct survival in Non-Small Cell Lung Cancer, OncoImmunology, DOI: 10.1080/2162402X.2018.1527498

To link to this article: https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1527498

View supplementary material

Published online: 19 Oct 2018.

Submit your article to this journal

Article views: 34

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=koni20

ONCOIMMUNOLOGY
https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1527498

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL RESEARCH

Check for updates

Circulating NKp46^{+} Natural Killer cells have a potential regulatory property and predict distinct survival in Non-Small Cell Lung Cancer

Emilie Picard[a], Yann Godet[a], Caroline Laheurte[a,b], Magalie Dosset[a], Jeanne Galaine[a], Laurent Beziaud[a], Romain Loyon[a], Laura Boullerot[a], Elodie Lauret Marie Joseph[a], Laurie Spehner[a], Marion Jacquin[b], Guillaume Eberst[c], Béatrice Gaugler[a], Françoise Le pimpec-Barthes[d], Elizabeth Fabre[e], Virginie Westeel[a,c], Anne Caignard [f], Christophe Borg[a,g], and Olivier Adotévi[a,g]

[a]University Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, LabEx LipSTIC, Besançon, France; [b]University Hospital of Besançon, INSERM CIC-1431 Clinical Investigation Center in Biotherapies, Besançon, France; [c]University Hospital of Besançon, Department of Pneumology, Besançon, France; [d]Service de Chirurgie Thoracique, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [e]Service d'Oncologie Médicale, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [f]INSERM, UMR1160, Institut Universitaire d'hématologie, Paris, France; [g]University Hospital of Besançon, Department of Medical Oncology, Besançon, France

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells are innate effector lymphocytes widely involved in cancer immunosurveillance. In this study, we described three circulating NK cell subsets in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Compared to healthy donors (HD), lower rate of the cytotoxic CD56^{dim} CD16^{+} NK cells was found in NSCLC patients (76.1% vs 82.4%, $P = 0.0041$). In contrast, the rate of CD56^{bright} NK cells was similar between patients and HD. We showed in NSCLC patients a higher rate of a NK cell subset with CD56^{dim} CD16^{-} phenotype (16.7% vs 9.9% $P = 0.0001$). The degranulation property and cytokines production were mainly drive by CD56^{dim} CD16^{-} NK cell subset in patients. Analysis of natural cytotoxicity receptors (NCRs) expression identified four distinct clusters of patients with distinct NK cell subset profiles as compared to one major cluster in HD. Notably the cluster characterized by a low circulating level of NKp46^{+} NK cell subsets was absent in HD. We showed that the rate of circulating NKp46^{+} CD56^{dim} CD16^{+} NK cells influenced the patients' survival. Indeed, the median overall survival in patients exhibiting high versus low level of this NK cell subset was 16 and 27 months respectively ($P = 0.02$). Finally, we demonstrated that blocking NKp46 receptor *in vitro* was able to restore spontaneous tumor specific T cell responses in NSCLC patients. In conclusion, this study showed a distinct distribution and phenotype of circulating NK cell subsets in NSCLC. It also supports the regulatory role of NKp46^{+} NK cell subset in NSCLC patients.

ARTICLE HISTORY
Received 27 April 2018
Revised 13 September 2018
Accepted 13 September 2018

KEYWORDS
NK cells; NSCLC ; NKp46; CD16; prognosis

Introduction

Natural killer (NK) cells, the most important effectors of innate lymphoid cells (ILCs), play a fundamental role in tumor immunosurveillance.[1–3] NK cells are subdivided into several subsets based on CD56 and CD16 relative expression, with different antitumor functions.[4] CD56^{dim} CD16^{+} NK cells are largely predominant in blood and have high cytotoxic properties mediated by a strong production of granzymes and perforin.[5] This function is regulated by a balance between a set of inhibitory and activating receptors such as CD16 which is critical to mediate antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC). The recognition of tumor cells by CD56^{dim} CD16^{+} NK cells involves other main activating receptors such as NKG2D and natural cytotoxicity receptors (NCRs) NKp30 and NKp46, which bind their respective ligands expressed on tumor cells.[6–8] CD56^{bright} CD16^{-} NK cells (CD56^{bright} NK) which are poorly cytotoxic and have a regulatory function,[9,10] contribute also in tumor immune control by secreting large amounts of IFN-γ.[11] More recently NK cell subsets such as CD56^{bright} CD16^{+} NK cells and CD56^{dim} CD16^{-} NK cells have been described but they are poorly found in healthy individuals and their functions are largely unknown.[10,12,13]

Tumor-infiltrating NK cells are associated with a better prognosis in several tumors[14,15] including in lung cancer, suggesting their implication in tumor control.[16] Thus, NK cells were characterized within the tumors and their phenotype and function were mainly investigated in patients' blood due to an easier access. A downregulation of NKG2D, NKp30 and NKp46 expression on NK cells was found in tumor microenvironment as well as in blood of patients with breast cancer, colorectal cancer, gastric and pancreatic cancer and melanoma.[17–23] This NK cells altered phenotype is correlated with a defective functionality highlighted by a reduction of both perforin level[19] and IFN-γ production.[20,24] It has also been reported in melanoma and colorectal cancer that the decrease of NKp46^{+} NK cells in advanced disease is associated with a decreased survival.[18,24] In this study, we described in

CONTACT Olivier Adotévi olivier.adotevi@univ-fcomte.fr INSERM, EFS BFC, UMR1098, 8 rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod, 25000, Besançon, France.
Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/koni.
Supplemental data for this article can be accessed here.
© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

NSCLC patients three main circulating NK cell subsets such as $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$, $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ and $CD56^{bright}$, NK cells. Subsequently, we evaluated their cytotoxic potential, analyzed the NCRs expression and also addressed the issue of their clinical influence.

Results

Distribution of peripheral NK cell subsets in NSCLC patients

NK cell subsets were measured in 176 NSCLC patients free of any treatment and 41 HD. Patients' main clinical characteristics at the time of sampling are indicated in Supplementary Table S1. For the flow cytometry analysis, total NK cells were gated among the lymphocyte population on $CD3^{-}$ $CD56^{+}$ cells. No differences were observed between the rate of total circulating NK cells from NSCLC patients and HD (15.1x vs 15.5% respectively) (Figure 1A). NK cells were further divided according to the expression of CD56 and CD16 markers. We found that both HD and NSCLC patients exhibited three distinct NK cell subsets: $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$, $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ and $CD56^{bright}$ NK cells (Figure 1B). Like in HD the majority of circulating NK cells in patients were of $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ phenotype (76.1%). But, there was a substantial decrease of the percentage of $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ NK cells in NSCLC patients as compared to HD (76.1 vs 82.4% respectively, $P = 0.0041$) (Figure 1B-C). The $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ and $CD56^{bright}$ NK cell subpopulations represented 16.7% and 5.6% of total NK cells respectively in NSCLC patients (Figure 1B).While we found a significant higher rate of $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ NK cells in NSCLC patients (16.7 vs 9.9%, $P = 0.0001$) (Figure 1D), no difference was observed between the frequency of $CD56^{bright}$ NK cells from patients and HD (Figure 1E). We confirmed that the three NK cell subsets found in the blood of NSCLC patients differ from $NCRs^{+}$ ILC3 by their lack of CD127 expression (Supplementary Fig. S1). These different subsets were homogeneously distributed according to patients' main clinical characteristics (Figure 1F and Supplementary Table S1). Thus, our results indicate that NSCLC patients exhibit high level of $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ NK cells and low rate of $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ NK cells in blood.

Cytotoxic and regulatory functions of NK cell subsets in NSCLC patients

Next, we asked for the cytotoxic property of each NK cell subsets. To this end we evaluated their degranulation capacity when exposed to NK-sensitive K562 tumor cells. As for HD, we showed that the percentage of total $CD107a^{+}$ NK cells from patients significantly increased in presence of K562 target cells ($P < 0.0001$ and $P = 0.003$ respectively) (Figure 2A). Conversely, the rate of total Granzyme B^{+} NK cells similarly decreased after K562 exposition both in patients and HD ($P = 0.004$ and $P = 0.015$ respectively) (Figure 2A). However, at the steady state, NSCLC patients exhibited higher circulating rate of Granzyme B^{+} NK cells than HD ($P = 0.003$). Next, we evaluated K562 cell death after culture with PBMCs from patients and HD. We found similar rates of annexin V^{+} $7\text{-}AAD^{-}$ (early apootosis) and annexin V^{+} $7\text{-}AAD^{+}$ (late apoptosis) K562 cells, between patients and HD (Figure 2B).

When we focused on each NK cell subset, the degranulation activity characterized by CD107a expression was mainly driven by $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ NK cells as compared to $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ commonly described as high cytotoxic subpopulation (23.4 vs 9.4% respectively, $P = 0.041$) (Figure 2C). However, the ability to produce Granzyme B against K562 was preferentially relied on $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ NK cell subset in NSCLC patients (Figure 2D). As expected $CD56^{bright}$ NK cells, a subset with regulatory properties,[10] showed a lower level of Granzyme B compared to $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ NK (19.3 vs 54.8% respectively, $P = 0.0002$), that was associated with a poor degranulation property against K562 cells (Figure 2C-D).

We next investigated the property of NK cell subsets to produce effector cytokines in response to K562 cells. Overall, circulating total NK cells both from NSCLC patients and HD were able to significantly produce IFN-γ and TNF-α in response to K562 cells (Figure 3A). We found that IFN-γ was mainly produced by $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ NK cells as compared to $CD56^{bright}$ NK cells (14.2 vs 6.3% respectively, $P = 0.048$) (Figure 3B). Similar observation was made about TNF-α production (5.5 vs 1.1% respectively, $P = 0.015$) (Figure 3C). As expected, $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ NK cell showed a low production of IFN-γ and TNF-α following K562 cells activation (Figure 3B-C). Of note, no obvious difference was observed between patients and HD about the capacity of NK cell subsets to produce IFN-γ and TNF-α (Figure3A-C). Moreover, we analyzed the capacity of NK cell subsets to secrete effector cytokines in response to different conditions of activation using cytokines involved in NK cell homeostasis and function.[5] We showed that the two main $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ and $CD56^{bright}$ NK cell subsets particularly secreted IFN-γ and TNF-α following stimulation with IL-2, IL-12 or IL-21 (Figure 3D). Collectively our results show that NK cells and especially $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ NK cells display both regulatory and degranulation functions in NSCLC patients.

Distinct profile of ncr-expressing NK cell subsets in NSCLC patients

To further characterize these circulating NK cell subsets, we analyzed the cell-surface expression of NKG2D and NCRs (NKp30, NKp44, NKp46) activating receptors. About NKG2D, only the rate of $NKG2D^{+}$ $CD56^{bright}$ NK cells was found increased in NSCLC patients as compared to HD (72.5 vs 61.4% respectively, $P = 0.0001$) (Figure 4A). No obvious difference was observed between patients and HD about $NKp30^{+}$ and $NKp44^{+}$ NK cell subsets (Figure 4B-C). In contrast, the percentage of each $NKp46^{+}$ NK cell subset was significantly lower in NSCLC patients than in HD (Figure 4D). Notably, we distinguished two groups of patients according to the low (< 37%) or high rate (> 37%) of circulating $NKp46^{+}$ NK cells (referred as $NKp46^{+}$ NK^{low} or $NKp46^{+}$ NK^{high} cells respectively) (Supplementary Fig. S2A). Of note, NSCLC stages did not seem to influence the rate of circulating

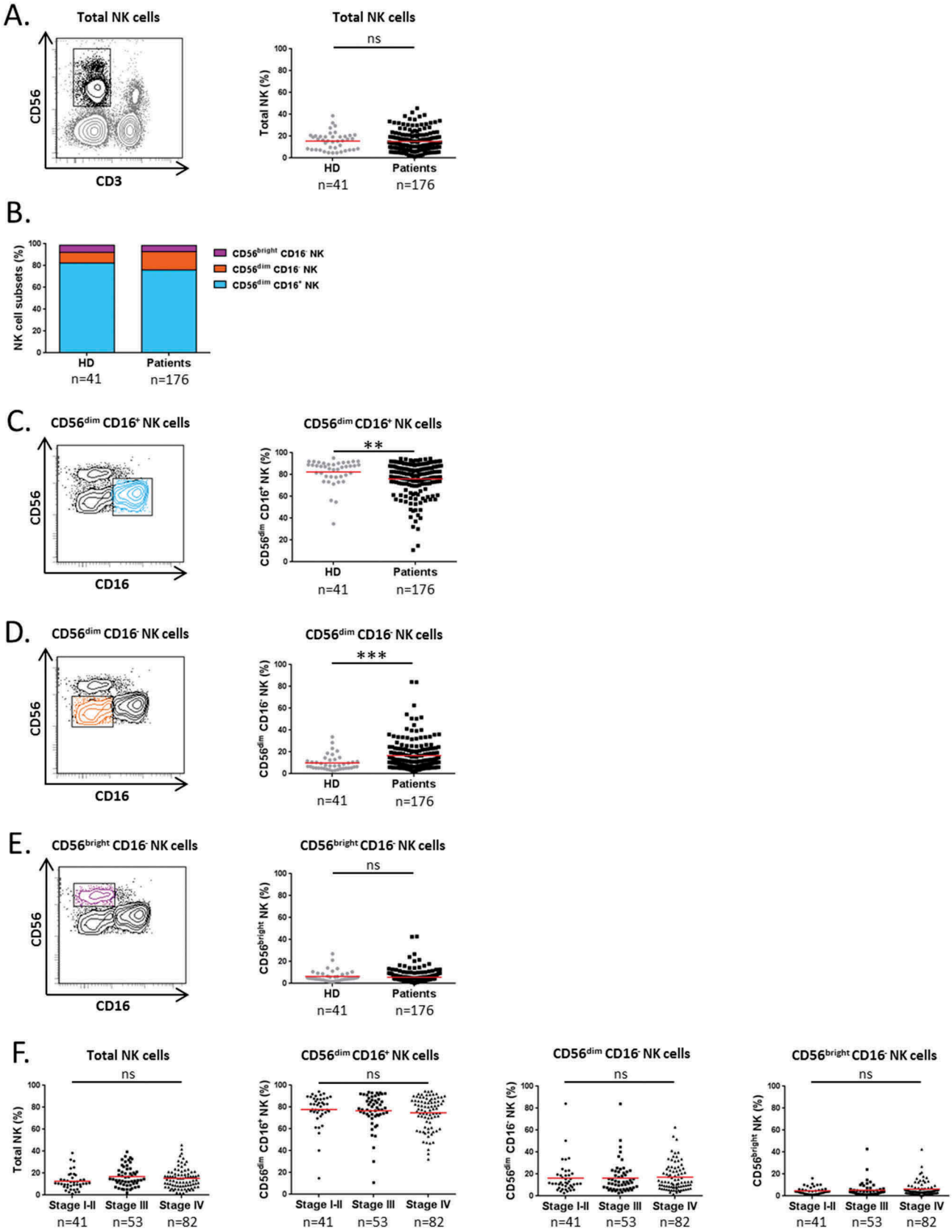


Figure 1. Distribution of NK cell subsets in the blood of NSCLC patients.

Representative flow cytometry gating strategy and proportion of circulating (A) total $CD3^-$ $CD56^+$ NK cells among PBMCs in HD (n = 41) and NSCLC patients (n = 176); and (C) $CD56^{dim}$ $CD16^+$, (D) $CD56^{dim}$ $CD16^-$ and (E) $CD56^{bright}$ $CD16^-$ NK cell subsets among total NK cells in HD (n = 41) and NSCLC patients (n = 176). (B) Frequency of each NK cell subsets in blood of HD (n = 41) and NSCLC patients (n = 176) represented by stacked bars. (F) Proportion of total NK cells among PBMCs and proportions of $CD56^{dim}$ $CD16^+$, $CD56^{dim}$ $CD16^-$ and $CD56^{bright}$ $CD16^-$ NK cell subsets among total NK cells in NSCLC patients according to the disease stage. Statistical analysis were performed using the Mann-Whitney test (two groups) or the Kruskal-Wallis test (more than two groups) (ns = not significant; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

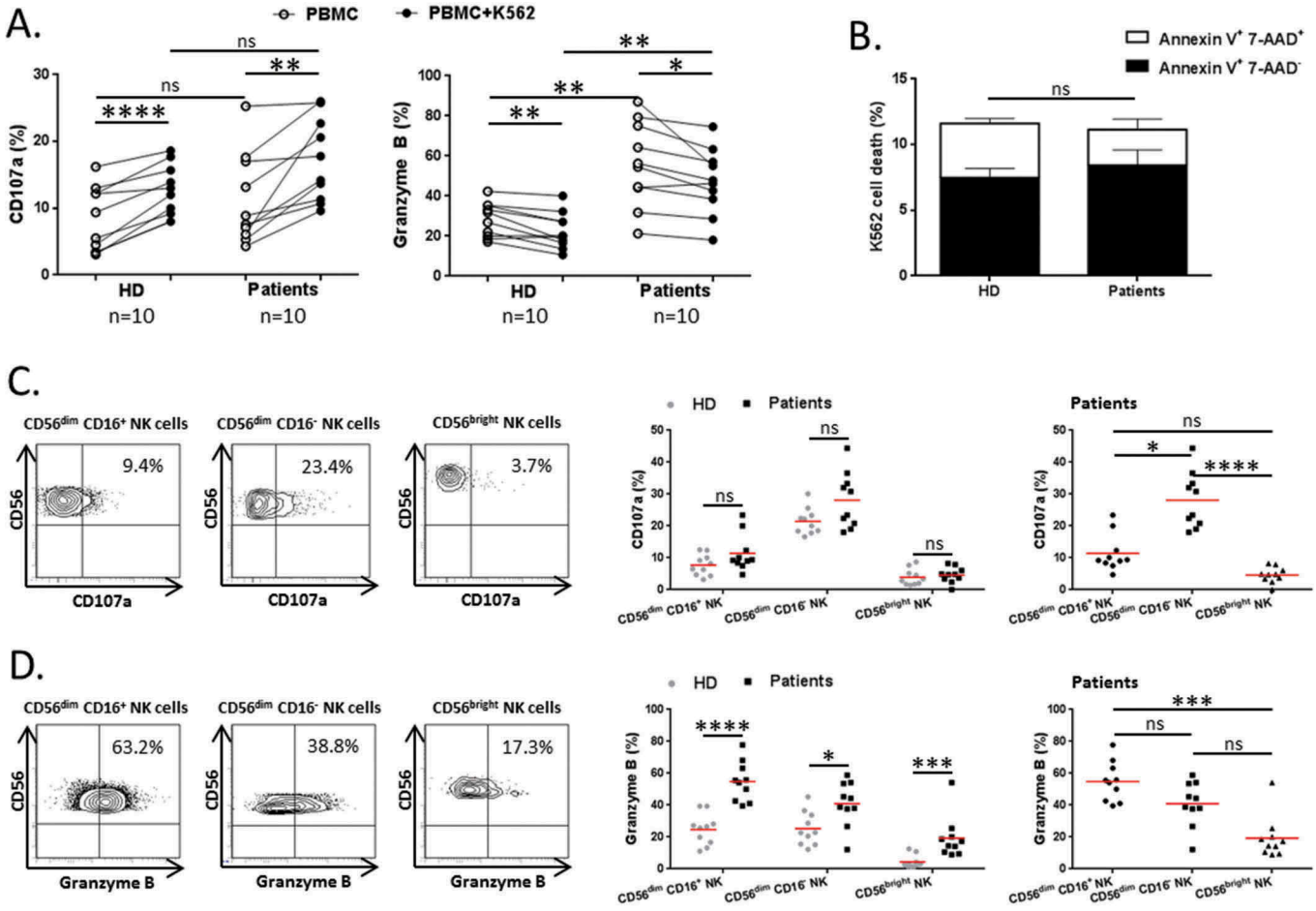


Figure 2. Blood NK cell cytotoxicity in NSCLC patients.

PBMCs from patients and HD were cultured with K562 cells for 6 hours at a ratio E:T of 1:1. (A) Degranulation of total NK cells among PBMCs was assessed by flow cytometry: percentages of total NK cells expressing CD107a (right panel) and Granzyme B (left panel) in HD (n = 10) and NSCLC patients (n = 10), Mann-Whitney test (ns = not significant; ** $P < 0.01$). Spontaneous (open circles) and K562-activated (solid circles) values are indicated, paired t-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$). (B) Percentages of K562 cell death represented by rates of annexin V^+ 7-AAD^+ and annexin V^+ 7-AAD^- K562 cells, after 6 hours of interactions with PBMCs from HD (n = 10) and NSCLC patients (n = 10), Mann-Whitney test (ns = not significant). Columns, mean of rates; bars, SEM. On the left panels, (C) degranulation and (D) Granzyme B production by NK cell subsets in response to K562 stimulation of a representative patient are showed. The percentages indicate the rate of $CD107a^+$ and Granzyme B^+ NK cells after gating on $CD56^{dim}$ $CD16^+$, $CD56^{dim}$ $CD16^-$ or $CD56^{bright}$ cells. On the right panels, are summarized rates of (C) $CD107a^+$ and (D) Granzyme B^+ among $CD56^{dim}$ $CD16^+$, $CD56^{dim}$ $CD16^-$ and $CD56^{bright}$ NK cell subsets of either both HD (grey n = 10) and patients (black n = 10), Mann-Whitney test (ns = not significant; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$), or only patients (black n = 10), Friedman test (ns = not significant; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). Red bars represent the mean of each group.

$NKp46^+$ NK cell subsets (Supplementary Fig. S2B). As expected, we observed a strong positive correlation between NKp46 on NK cells and the other activating receptors among NSCLC patients (Supplementary Table S2).

Unsupervised hierarchical clusterings (heatmap) according to the NCRs-expressing NK cell subsets identified four clusters of NSCLC patients (Figure 5A). The cluster 1 (CL1) gathered patients with globally high level of NCRs on all NK cell subsets. The cluster 2 (CL2) was characterized by a lower rate of $NKp44^+$ NK cells compared to CL1. Patients from cluster 3 (CL3) have both a reduced level of $NKp44^+$ and $NKp46^+$ NK cells. Finally, the last cluster (CL4) with heterogeneous expression of NCR included only 5 patients, thus it was not included for further analysis. In contrast, the heatmap showed one major cluster in HD corresponding to CL2 found in patients (Figure 5B). Remarkably, the cluster 3 from NSCLC patients characterized by a low/moderated level of circulating $NKp46^+$ NK cells, was totally absent in HD. The cluster distribution was similar for patients' main clinical characteristics (data not shown). We further analyzed the expression of co-inhibitory receptors such as TIM3 and PD-1 known to be expressed by NK cells.[25–28] TIM3 was significantly higher in NK cells from NSCLC patients than in HD (19.7 vs 5.9% respectively, $P < 0.0001$) and was preferentially expressed by $CD56^{dim}$ $CD16^+$ NK cell subset (Supplementary Fig. S2C). Similarly, the percentage of $PD\text{-}1^+$ NK cells was significantly increased in NSCLC patients as compared to HD (1.6 vs 0.4% respectively, $P = 0.008$) and also for the whole of subsets (Supplementary Fig. S2C).

These results show distinct levels of $NCRs^+$ NK cells in NSCLC patients and especially a subgroup that exhibiting a low rate of circulating $NKp46^+$ NK cells.

The level of circulating nkp46$^+$ NK cells influences the overall survival

We investigated the prognostic value of circulating NK cell subsets on four years-overall survival (OS) of patients. There was no association of the level (low or high according to the

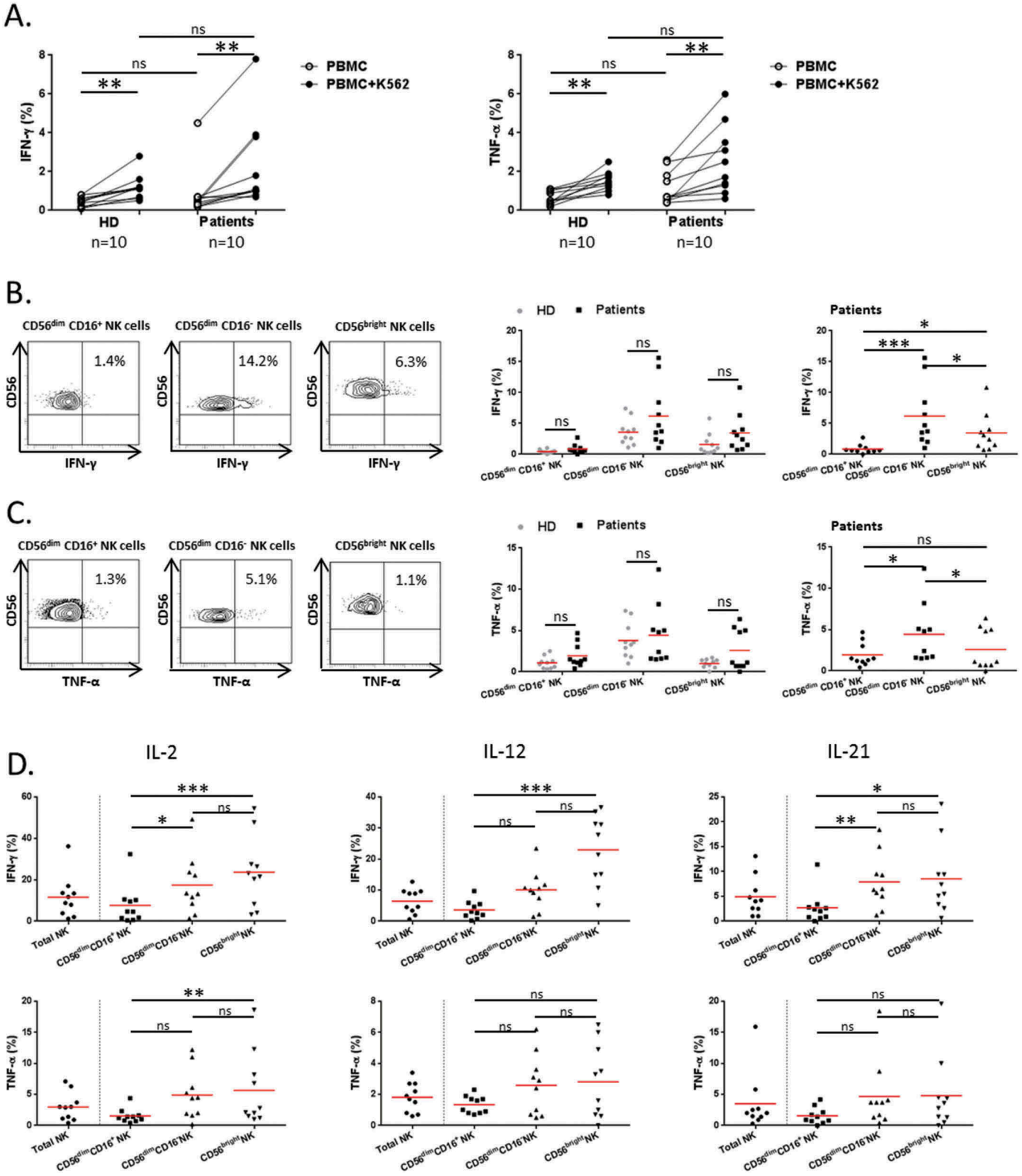


Figure 3. Regulatory function of NK cells in NSCLC patients.

PBMCs from patients and HD were activated with K562 cells for 6 hours at a ratio E:T of 1:1. (A) Cytokines production of total NK cells among PBMCs was assessed by flow cytometry: percentages of total NK cells producing IFN-γ (left panel) and TNF-α (right panel) in HD (n = 10) and NSCLC patients (n = 10), Mann-Whitney test (ns = not significant). Spontaneous (open circles) and K562-activated (solid circles) values are indicated, paired t-test (** $P < 0.01$). On the left panels, (B) IFN-γ and (C) TNF-α production by NK cell subsets in response to K562 stimulation of a representative patient are showed. The percentages indicate rates of IFN-γ^+ and TNF-α^+ NK cells after gating on $CD56^{dim}$ $CD16^+$, $CD56^{dim}$ $CD16^-$ or $CD56^{bright}$ cells. On the right panels, are summarized rates of (B) IFN-γ^+ and (C) TNF-α^+ among $CD56^{dim}$ $CD16^+$, $CD56^{dim}$ $CD16^-$ and $CD56^{bright}$ NK cell subsets of either both HD (grey n = 10) and patients (black n = 10), Mann-Whitney test (ns = not significant), or only patients (black n = 10), Friedman test (ns = not significant; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$) Red bars represent the mean of each group. (D) PBMCs from patients were activated with IL-2, (1000U/mL), IL-12 (10ng/mL) or IL-21 (50ng/mL) for 20 hours. Proportions of IFN-γ^+ and TNF-α^+ among total, $CD56^{dim}$ $CD16^+$, $CD56^{dim}$ $CD16^-$ and $CD56^{bright}$ NK cell subsets in NSCLC patients (n = 10), Friedman test (ns = not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Red bars represent the mean of each group.

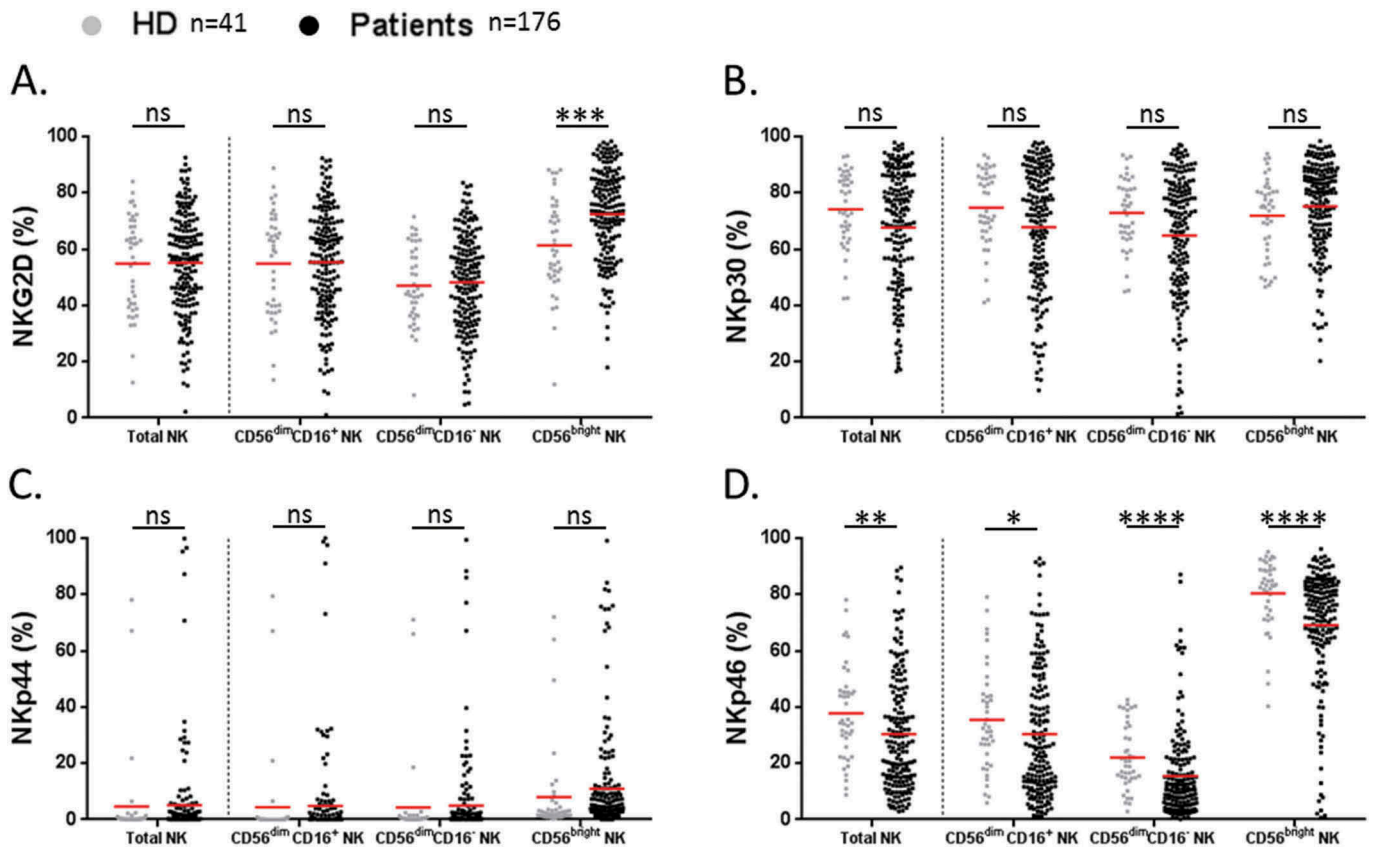


Figure 4. Analysis of activating receptors on NK cell subsets in NSCLC patients.
Proportions of (A) NKG2D^{+}, (B) NKp30^{+}, (C) NKp44^{+} and (D) NKp46^{+} among total, CD56^{dim} CD16^{+}, CD56^{dim} CD16^{-} and CD56^{bright} NK cell subsets in HD (grey n = 41) and NSCLC patients (black n = 176). Red bars represent the mean of each group. Statistical analysis were performed using the Mann-Whitney test (ns = not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

mean percentage) of total circulating NK cells or the three described NK cell subsets with the OS (Supplementary Fig. S3A-D). Next we wondered whether the level NCRs^{+} NK cell subsets influenced the outcome. To this end we defined two groups of patients according to the low or high circulating level of each NCRs^{+} NK cell subset. No association of the level of circulating NKp44^{+} or NKp30^{+} NK cell subsets with survival was observed (data not shown).

However, we showed that the level of NKp46^{+} NK cells influenced the OS. Indeed the total NKp46^{+} NK^{low} is significantly associated with a better OS (median OS, 24 vs 16 months, $P = 0.04$) (Figure 6A). Notably, we found that this association with OS was significantly driven by the NKp46^{+} CD56^{dim} CD16^{+} subset (median OS, 27 vs 16 months, $P = 0.02$) (Figure 6B-D). Indeed, no association between the level of NKp46^{+} CD56^{bright} or NKp46^{+} CD56^{dim} CD16^{-} NK cells and the OS was found (Figure 6C-D). Thus, the level of circulating NKp46^{+} CD56^{dim} CD16^{+} NK cells predicts distinct outcome in NSCLC.

Blockade of nkp46 pathway restored tumor-specific th1 response

A recent study reported the inhibitory effect of a subset of tumor-infiltrating NKp46^{+} CD3^{-} CD56^{+} cells against effector T cells in the tumor microenvironment of ovarian cancer patients.[29] So, we assessed whether the circulating NKp46^{+} NK cell subset could exert similar effect on tumor-specific T cell responses detected in blood. To this end, PBMCs from NSCLC patients were cultured with telomerase (TERT)-derived peptides in presence or not of anti-NKp46 monoclonal blocking antibody previously described.[29,30] The presence of tumor-specific T cell response was measured by IFN-γ ELISpot assay (Figure 7A). As shown in patients in Figure 7B, the addition of anti-NKp46 in the culture was able to restore or increase the antitumor Th1 response *in vitro* ($P = 0.052$), suggesting that NKp46^{+} NK cells could exert an inhibitory effect in a contact depend-manner. In line with this, we showed a positive correlation between the concentration of TGF-β and the level of NKp46^{+} NK cells. Conversely, the level of this NK cell subset was inversely correlated with the IL-10 concentration (Supplementary Fig. S4A-B). We also found a low level of inflammatory cytokines such as TNF-α and IL-21 associated with high circulating rate of NKp46^{+} CD56^{dim} CD16^{+} NK cells in the serum of NSCLC patients (Figure 7C).

Collectively, our results demonstrate that low level of peripheral NKp46^{+} CD56^{dim} CD16^{+} NK cells is associated with better survival in lung cancer and also highlights a potential regulatory property of this NK cell subset.

Discussion

Tumor-induced modifications of NK cell phenotype and function is a well-known mechanism contributing to the tumor escape.[31] Here we described three circulating NK cell subsets in NSCLC patients such as CD56^{dim} CD16^{+}, CD56^{dim}

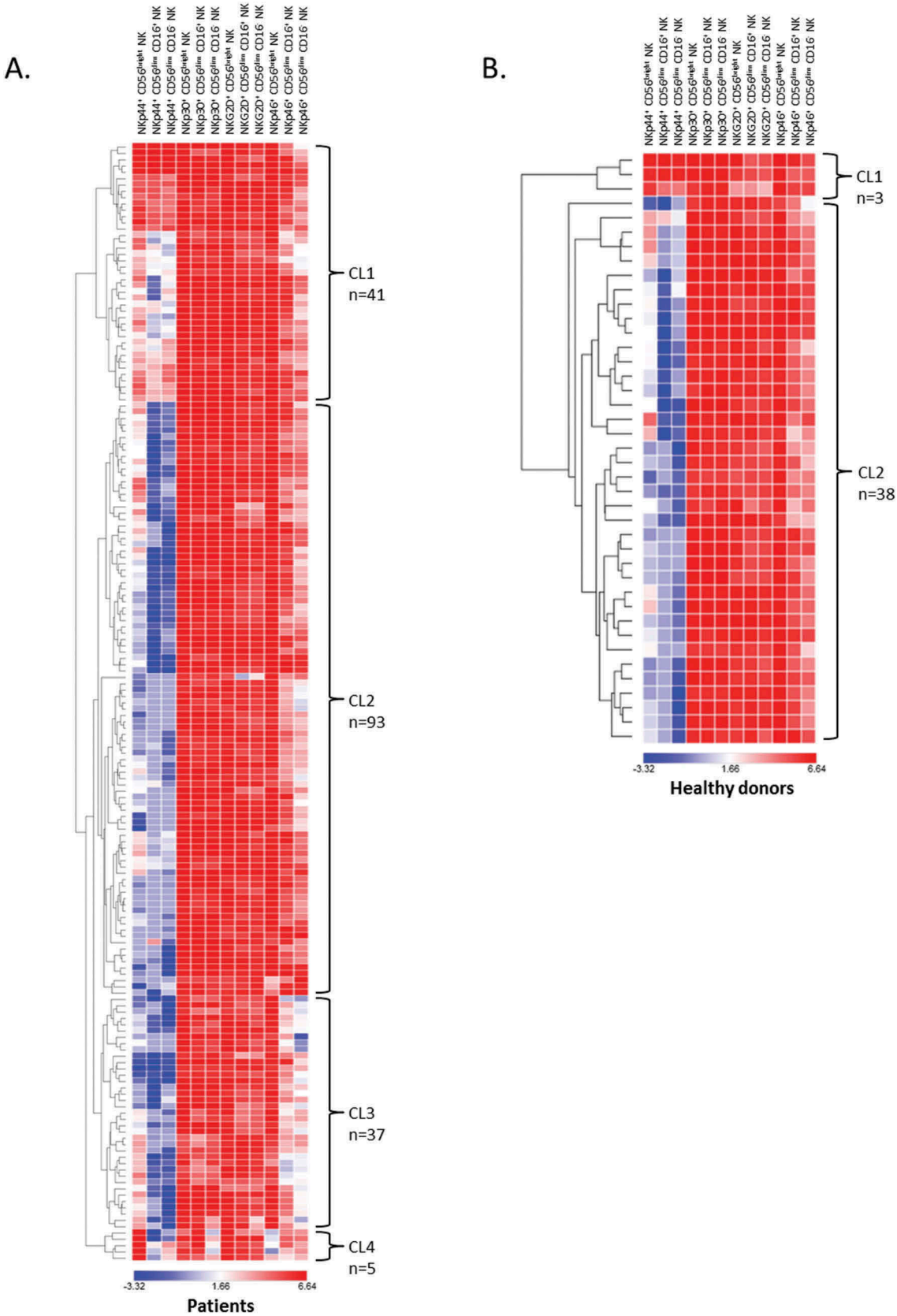


Figure 5. Hierarchical clustering of NK cell activating receptors.

Hierarchical clustering of (A) NSCLC patients (n = 176) and (B) HD (n = 41) was realized according to NKp44, NKp30, NKG2D and NKp46 expression on NK cell subsets. The percentage values obtained for the Figure 3 were used and the clustering was performed using Morpheus Software.

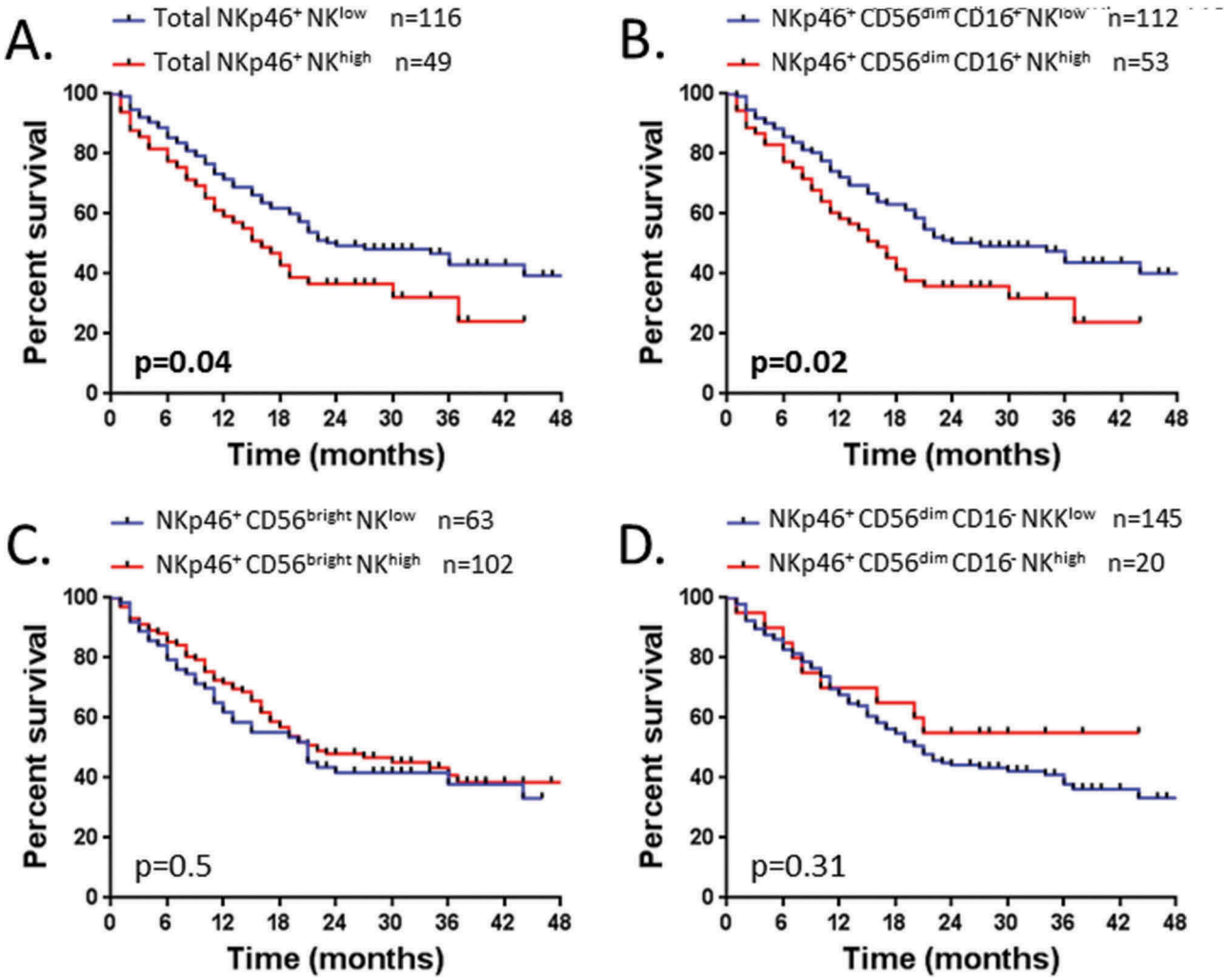


Figure 6. Patients' survival according to the rate of NK cell subsets expressing NKp46.

Survival of patients is depicted as Kaplan-Meier curves. Patients (n = 165) were divided into two groups low and high as detailed in result section, graphically defined by a cut off value of 37% for (A) NKp46$^+$ NK cells and (B) NKp46$^+$ CD56^{dim} CD16$^+$ NK cells; and defined by the percentage mean value of: (C) NKp46$^+$ CD56^{bright} NK cells (mean = 59%) and (D) NKp46$^+$ CD56^{dim} CD16$^-$ NK cells (mean = 29%). Statistical analysis was performed using the Log-Rank test.

CD16$^-$ and CD56^{bright} NK cells. While the cytotoxic and regulatory functions of NK cells, mainly driven by CD56^{dim} CD16$^-$ NK cell subset, were similar between patients and HD, we found differences about NK cell phenotype. Indeed, the rate of all of these NK cell subsets expressing NKp46 is significantly lower in NSCLC patients as compared to HD. Notably, we showed in NSCLC patients that a low rate of NKp46$^+$ CD56^{dim} CD16$^+$ NK cells is significantly associated with a better OS.

The analysis of NK cells based on CD56 and CD16 expression highlighted three main NK cell subsets in both NSCLC patients and HD. Although similar rate of the regulatory CD56^{bright} NK cell subset[12] was found between patients and HD, lower circulating level of the cytotoxic CD56^{dim} CD16$^+$ NK subsets[10] was observed in NSCLC patients. We also observed in peripheral blood of NSCLC patients a higher rate of a NK cell subset with CD56^{dim} CD16$^-$ phenotype as compared to HD. This subset differs from NCR$^+$ ILC3[3] by its lack of CD127 expression. According with our results, the rate of NK cells expressing CD16 which has been reported in NSCLC patients,[32,33] such as 76.9%[34] or 80%[35] is similar to those of CD56^{dim} CD16$^+$ NK cells in our study (76.1%). Moreover, Bruno *et al.* described around 17% of CD16$^-$ NK cells in the blood of NSCLC patients which is very close to the value of the rate of CD56^{dim} CD16$^-$ NK cells in our cohort (16.7%).[35] All of these studies support our results that NSCLC patients display a high rate of circulating CD56^{dim} CD16$^-$ NK cells. Nevertheless, although recent studies identified these CD56^{dim} CD16$^-$ NK cells as a distinct subset their ontogeny remains unclear.[10,12,13] Indeed, several studies described a quick shedding of CD16 from NK cell surface upon activation due to metalloproteases.[36,37] Future investigations are required to assess whether CD56^{dim} CD16$^-$ NK cells represent a specific differentiation of circulating NK cells or derived from another mechanisms.[38–40]

While we found a similar NK cells-cytotoxic and regulatory functions in both patients and HD, our results also demonstrated that these CD56^{dim} CD16$^-$ NK cells exert a superior degranulation capacity against K562 cells and produce more amounts of IFN-γ and TNF-α than the two others circulating NK cell subsets found in NSCLC. Although CD56^{dim} NK cells are well known for their cytotoxic activity,

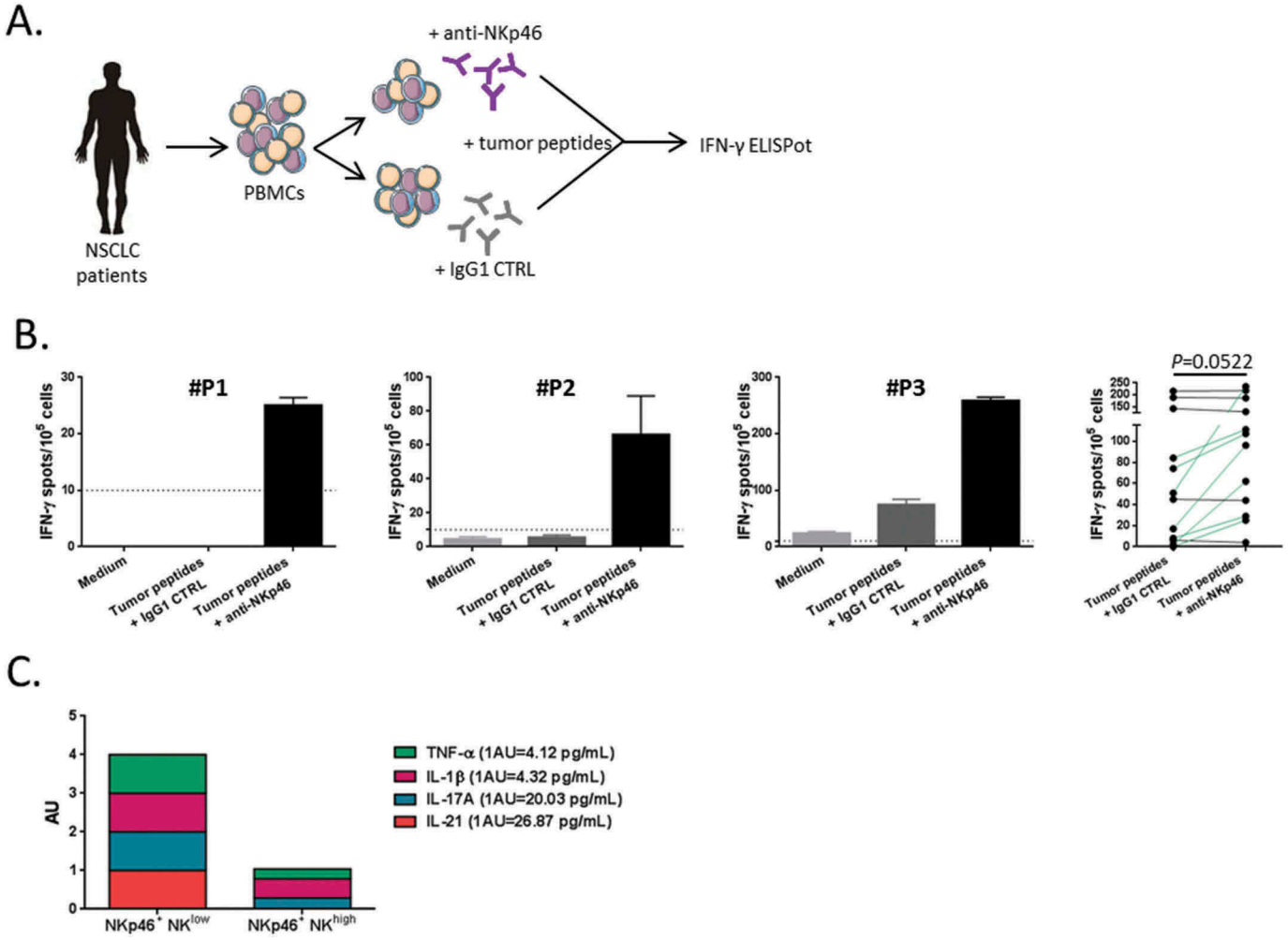


Figure 7. Blockade of NKp46 restored tumor-specific T cell response.

(A) Blood lymphocytes from NSCLC patients were stimulated with tumor-derived peptides in presence or not of blocking antibodies (mAb) against NKp46. (B) Three representative examples and the whole of number of IFN-γ-producing antitumor Th1 cells measured by ELISpot assay with IgG1 isotype control or anti-NKp46 mAb are showed in NSCLC patients (n = 11), paired t-test. Columns, mean of spots from triplicate wells; bars, SEM. (D) Cumulative representation of normalized (arbitrary unit) cytokines concentrations (TNF-α, IL-1β, IL-17A and IL-21) in serum of patients with low or high rate of NKp46^{+} CD56^{dim} CD16^{+} NK cells.

CD56^{dim} CD16^{+} NK cells were rather described as responsible for ADCC and CD56^{dim} CD16^{-} NK cells for natural cytotoxicity.[41,42] The high capacity of response of CD56^{dim} CD16^{-} NK cells to K562 cells may suggest a potential involvement of this subset in cancer immunosurveillance.

Analysis of NCRs expression on NK cells revealed several groups of patients and HD. Two clusters CL1 and CL2 were shared by both HD and NSCLC patients with a main cluster represented by CL2. Another third cluster CL3 was only found in lung cancer patients. This cluster showed a lower expression of NCRs and particularly the activating receptor NKp46 on NK cells. Grouped analysis of NCRs and NKG2D expression on NK cells confirmed the heatmap results by revealing significant lower rates of NKp46^{+} NK cell subsets in NSCLC patients as compared to HD. Nonetheless, the disease stage didn't have impact on the rate of activating receptor expression on NK cell subsets.

Although NKp46 is the main activating receptor involved in NK cell functions,[43,44] the downregulation of this receptor observed in our study has also been reported in many other cancers.[17–19,24,45,46] This suggests an involvement of tumor-related factors in the phenotypic alteration of NK cells. Indeed, some immune suppressive cytokines or soluble factors such as TGF-β or IDO secreted by tumor cells or stromal cells have been shown to decrease the expression of NCRs or NKG2D on NK cells.[47,48] Moreover, tumor cells are able to release a soluble form of MIC ligands which keeps away NK cells and downregulates NKG2D expression.[49,50] Thus possible NKp46 ligands or immunosuppressive factors released from tumor cells and could also promote a downregulation of NKp46 on NK cells. On this view, we investigated the correlation between the rate of NKp46^{+} NK cells and the concentration of several cytokines in the serum of patients. We found a positive correlation between the concentration of TGF-β and the level of NKp46^{+} NK cells while IL-10 is inversely correlated.

While other circulating NK cells expressing NCRs or NKG2D don't have any prognostic role, we notably found an inverse correlation between patients' survival and the rate of NKp46 CD56^{dim} CD16^{+} NK cells. Thus, we showed that patients with NKp46^{+} NK^{low} cells had a better survival than those with NKp46^{+} NK^{high} cells. This observation is

unexpected because previous studies reported conflicting results in melanoma and colorectal cancer where a low rate of NKp46$^+$ NK cells in blood was associated with poor prognosis.[18,24] Several parameters could explain this discrepancy. A very low number of patients have been evaluated in these studies.[18,24] Furthermore, in the study by Fregni *et al.*, the association between the level of NKp46$^+$ NK cells and the survival had only found in metastatic melanoma patients.[24] Moreover, the cut-off value of NKp46$^+$ NK cells rate used to define the groups of patients is around 80% in melanoma and colorectal cancer versus 37% in our study.[18,24]

One hypothesis that could explain the worse prognosis of patients with high rate of NKp46$^+$ NK cells likely involved the crosstalk between NKp46$^+$ NK cells and adaptive T cell immunity. Indeed, it has been reported that NK cells are able to regulate T cell immunity by soluble factors or by direct cell contact.[29,51] For example, the IFN-γ production by NK cells is well known to promotes the priming of Th1-polarized immunity.[52] A recent study reported that a subset of tumor-infiltrating NKp46$^+$ CD3$^-$ CD56$^+$ cells prevent the expansion of antitumor T cells by mechanism involving NKp46.[29] In line with this study, we also showed that the blockade of Nkp46 receptor *in vitro* effectively reinvigorates the IFN-γ production by TERT-specific CD4 Th1 cells. We previously demonstrated that the presence of circulating anti-TERT Th1 cells in cancer patients is associated with better survival.[53–55] Thus we believed that the worse prognostic value found in population with NKp46$^+$ NK^{high} cells could be due to the ability of these NK cells to suppress anti-tumor Th1 immunity. Although our observation also suggests that NKp46$^+$ NK cells could exert its negative control on antitumor T cells in a contact depend-manner, we demonstrated a positive correlation between the rate of NKp46$^+$ NK cells and the level of TGF-β in the serum of patients, which is a cytokine known to be of poor prognosis in NSCLC.[56] In contrast to immune profile shown in patients with NKp46$^+$ NK^{high} cells, we showed a trend of inflammatory signature profile in patients with NKp46$^+$ NK^{low} cells. Another hypothesis that could explain the worse prognosis of patients with high rate of NKp46$^+$ NK cells is the expression of co-inhibitory receptors such as PD-1 or TIM-3. Indeed, a previous study in lung cancer reported that a high expression of TIM-3 on NK cells was associated with poor survival of patients.[57] However in our study, no obvious difference of TIM3 and PD-1 levels was found regardless NKp46 expression (data not shown). Thus, we speculated that NKp46$^+$ NK cells could drive an immunosuppressive environment which prevents adaptive T cell immunity. However, future investigations are needed to address the mechanisms by which NKp46 acts on antitumor T cell responses.

In conclusion, our study describes the presence of distinct circulating NK cell subsets and highlights an alteration of NKp46 pathway in NSCLC patients. This study also supports a regulatory role of NKp46$^+$ NK cells in lung cancer.

Materials and methods

Patients and healthy donors

Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) patients were from TeloCap01 cohort, a prospective multicenter immunomonitoring study conducted in the European Hospital Georges Pompidou (Paris) and the University Hospital of Besançon between July 2010 and January 2014 (N°EUDRACT: 2009-A00642-55). Patient blood samples were collected before any treatment including surgery. Information about patients' survival was collected at one and two-years after the inclusion. All patients had given their written consent and the protocol was approved by local and national ethic committees. For healthy volunteer donors, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from anonymous donors at the Etablissement Français du Sang (EFS, Besançon, France) as apheresis kit preparation after the signature of the informed consent and following the EFS guidelines. Patients' and donors' blood samples were isolated and frozen until use.

Flow cytometry analysis

PBMCs were stained for 20 minutes at 4°C with conjugated antibodies: anti-CD3-V500 (Biolegend, 613406), anti-CD16-APC H7 (BD Biosciences, 554529), anti-CD56-eFluor 710 (eBioscience, 46–0567-42), anti-NKp30-PE (BD Biosciences, 558407), anti-NKp44-APC (R&D System, IC0041P), anti-NKp46-V450 (BD Biosciences, 562099), anti-NKG2D-PeCy7 (BD Biosciences, 557924), anti-PD-1-Pecy7 (Biolegend, 367414) and anti-TIM3-APC (Biolegend, 345012). Cells were analyzed with BD Facs Canto II flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed with BD Facs Diva software.

Cell culture and cd107a degranulation assay

PBMC were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen) supplemented with 10% human serum and 1% Penicillin-Streptomycin. K562 cells derived from human leukemia cell line were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% Penicillin-Streptomycin.

For CD107a degranulation assay, PBMCs were cultured with K562 cells at 1:1 effector/target (E/T) ratio, for 6 hours at 37°C with golgi stop (BD Biosciences, 554724) and anti-CD107a-PE (BD Biosciences, 555801) or isotype control (BD Biosciences, 555749). Cells were then stained for 20 minutes at 4°C with anti-CD3-PB (BD Biosciences, 558117), anti-CD56-eFluor 710 (eBioscience, 46–0567-42) and anti-CD16-FITC (BD Biosciences, 555406).

Cytokines secretion assay

For measurement of intracellular IFN-γ, TNF-α and Granzyme B, PBMCs were cultured with K562 cells at 1:1 E/T ratio for 6 hours or were stimulated with 1000U/mL IL-2 (Peprotech, 200–02), 10ng/mL IL-12 (Miltenyi Biotec, 130–096-704) or 50ng/mL IL-21 (Shenandoah Biotechnology Inc, 100–90) for 20 hours, at 37°C. Golgi plug (BD Biosciences, 555029) was added to cultures during the last 6 hours of stimulation. PBMCs were then stained for 20 minutes at 4°C with anti-CD3-PB (BD Biosciences, 558117), anti-CD56-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences, 560842) and anti-CD16-FITC (BD Biosciences, 555406). After cell surface staining, cells were fixed and permeabilized using Cytofix/CytoPerm kit (BD Biosciences, 554714) and stained with anti-IFN-γ-APC (BD

Biosciences, 554702), anti-TNF-α-PE (Biolegend, 502909) and anti-Granzyme B-BV510 (BD Biosciences, 563388).

Cytotoxicity assay

K562 cells were labeled with CFSE (CellTrace CFSE Cell proliferation Kit, Molecular Probe) at 5μM in PBS 1X (Gibco Invitrogen) for 15 min under agitation. Then 2 volumes of fetal calf serum were added and cells were again incubated under agitation for 10 min. Finally, cells were washed twice with PBS 1X before culture. K562 cells were cultured with PBMCs at 1:1 E/T ratio, for 6 hours at 37°C. Cells were then stained for 15 minutes at room temperature with anti-Annexin V-APC (BD Biosciences, 550475) and anti-7-AAD (BD Biosciences, 559925) in 1X Annexin V binding buffer (BD Biosciences, 556454). Dead cells were analyzed after gating on CFSE positive K562 cells.

Synthetic peptides

We previously reported four HLA-DR and four HLA-DP4-restricted telomerase (TERT)-derived peptides that can be used for the monitoring of anti-TERT Th1 responses.[53,58] These peptides were purchased from CTL (Cellular Technology Ltd, Germany).

Assessment of tumor antigen-specific t-cell responses

Tumor-specific Th1 response was assessed using a short-term *in vitro* stimulation with TERT-derived peptides as described previously.[53,58] Briefly, PBMCs from patients or HD were cultured in 24-well plates with TERT-derived peptides (5μg/mL) in presence of anti-NKp46 mAb (5μg/mL, BD Biosciences, 557847) or IgG1 isotype control (5μg/mL, BD Biosciences, 554721). At day 10, the TERT-specific T cell specificity was investigated by IFN-γ ELISpot assay. Cells were seeded in triplicates in anti-human IFN-γ monoclonal antibody pre-coated ELISpot plates with TERT-derived peptides (5μg/mL) or with medium in X-VIVO 15 (control) for 18 hours at 37°C. The IFN-γ spots were revealed following the manufacturer's instructions (Diaclone). Spot-forming cells were counted using the CTL Immunospot system. The number of specific T-cells expressed as spot forming cells per 10^5 cells was calculated after subtracting negative control values (background).

Cytokine assay by CBA

Concentrations of IL-1β, IL-10, IL-17A, IL-21, TNF-α and TGF-β in undiluted sera samples of patients were measured using Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set kits according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, 558279, 558274, 560383, 560358, 560112, 560429 respectively). Samples were acquired using BD Facs Canto II flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed with FCAP Array Software (BD Biosciences).

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software. Descriptive analyses are expressed as mean or median. For two-group comparisons, the nonparametric Mann-Whitney U-test was used. For multiple-group comparisons, the nonparametric unpaired Kruskal-Wallis test or paired Friedman test were used. Proportions were compared using the X2-test. Correlations were performed using the nonparametric Spearman test. Hierarchical cluster analysis and dendrograms were performed using the online Morpheus software and robust Z-score normalization (https://software.broadinstitute.org/morpheus/). Overall survival (OS) was calculated from the date of study enrollment to the date of death from any cause. Patients known to be alive were censored at the time of their last follow-up assessment. The survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method and compared using the Log-Rank test. *P* values less than 0,05 were considered significant (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0.0001$).

Acknowledgments

We thank all patients who contributed to this study. We thank all of the medical doctors, nurses from thoracic oncologic department of university hospital of Besançon and European Georges Pompidou hospital in Paris, for their contributions. The authors also thank the Biomonitoring plateform of CIC-1431 for their technical support.

Disclosure of interest

The authors report no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the Conseil Régional de Franche-Comté; Ligue Contre le Cancer;Assistance Publique des Hôpitaux de Paris;

ORCID

Anne Caignard http://orcid.org/0000-0001-9923-6045

References

1. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. Oncogene. 2008;27(45):5932–5943. doi:10.1038/onc.2008.267.
2. Guillerey C, Mj S. NK Cells and Cancer Immunoediting. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;395:115–145. doi: 10.1007/82_2015_446.
3. Del Zotto G, Marcenaro E, Vacca P, Sivori S, Pende D, Della Chiesa M, Moretta F, Ingegnere T, Mingari MC, Moretta A, et al. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. Cytometry B Clin Cytom. 2017;92(2):100–114. doi: 10.1002/cyto.b.21508.
4. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. J Immunol. 1989. 143(10):3183–3191.
5. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001;22(11):633–640. doi:10.1016/S1471-4906(01)02060-9.
6. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, Haldeman B, Ostrander CD, Kaifu T, Chabannon C, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. J Exp Med. 2009;206(7):1495–1503. doi: 10.1084/jem.20090681.

7. Hecht M-L, Rosental B, Horlacher T, Hershkovitz O, De Paz JL, Noti C, Schauer S, Porgador A, Seeberger PH. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. J Proteome Res. 2009;8(2):712–720. doi:10.1021/pr800747c.
8. El-Gazzar A, Groh V, Spies T. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. J Immunol. 2013;191(4):1509–1515. doi:10.4049/jimmunol.1301071.
9. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. Blood. 2001. 97(10):3146–3151.
10. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. Immunology. 2009;126(4):458. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.
11. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol. 2008;9(5):503–510. doi:10.1038/ni1582.
12. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Human ZJ. CD56bright NK Cells: an Update. J Immunol. 2016;196(7):2923–2931. doi:10.4049/jimmunol.1502570.
13. Penczek A, Sienczyk M, Wirtz CR, Burster T. Cell surface cathepsin G activity differs between human natural killer cell subsets. Immunol Lett. 2016;179:80–84. doi: 10.1016/j.imlet.2016.09.010.
14. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. Cancer. 1997. 79(12):2320–2328.
15. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. Cancer. 2000. 88(3):577–583.
16. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuil M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. Lung Cancer Amst Neth. 2002. 35(1):23–28.
17. Nieto-Velázquez NG, Torres-Ramos YD, Muñoz-Sánchez JL, Espinosa-Godoy L, Gómez-Cortés S, Moreno J, Moreno-Eutimio MA. Altered Expression of Natural Cytotoxicity Receptors and NKG2D on Peripheral Blood NK Cell Subsets in Breast Cancer Patients. Transl Oncol. 2016;9(5):384–391. doi:10.1016/j.tranon.2016.07.003.
18. Rocca YS, Roberti MP, Juliá EP, Pampena MB, Bruno L, Rivero S, Huertas E, Sánchez Loria F, Pairola A, Caignard A, et al. Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15. Front Immunol. 2016;7. doi: 10.3389/fimmu.2016.00413.
19. Peng Y-P, Zhu Y, Zhang -J-J, Xu Z-K, Qian Z-Y, Dai -C-C, Jiang K-R, Wu J-L, Gao W-T, Li Q, et al. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. J Transl Med. 2013;11:262. doi: 10.1186/1479-5876-11-262.
20. Mamessier E, Sylvain A, Bertucci F, Castellano R, Finetti P, Houvenaeghel G, Charaffe-Jaufret E, Birnbaum D, Moretta A, Olive D. Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. Cancer Res. 2011;71(21):6621–6632. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0792.
21. Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, Jović V, Jurisić V, Babović N, Spuzić I. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. Clin Exp Metastasis. 2007;24(1):1–11. doi:10.1007/s10585-006-9043-9.
22. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. J Clin Invest. 2011;121(9):3609–3622. doi: 10.1172/JCI45816.
23. Shen Y, Shen Y, Lu C, Lu C, Tian W, Tian W, Wang L, Wang L, Cui B, Cui B, et al. Possible association of decreased NKG2D expression levels and suppression of the activity of natural killer cells in patients with colorectal cancer. Int J Oncol. 2012;40(4):1285–1290. doi: 10.3892/ijo.2011.1315.
24. Fregni G, Messaoudene M, Fourmentraux-Neves E, Mazouz-Dorval S, Chanal J, Maubec E, Marinho E, Scheer-Senyarich I, Cremer I, Avril M-F, et al. Phenotypic and functional characteristics of blood natural killer cells from melanoma patients at different clinical stages. PloS One. 2013;8(10):e76928. doi: 10.1371/journal.pone.0076928.
25. Beldi-Ferchiou A, Lambert M, Dogniaux S, Vély F, Vivier E, Olive D, Dupuy S, Levasseur F, Zucman D, Lebbé C, et al. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. Oncotarget. 2016;7(45):72961–72977. doi: 10.18632/oncotarget.12150.
26. Liu Y, Cheng Y, Xu Y, Wang Z, Du X, Li C, Peng J, Gao L, Liang X, Ma C. Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers. Oncogene. 2017;36(44):6143–6153. doi:10.1038/onc.2017.209.
27. Wang Y, Sun J, Gao W, Song B, Shao Q, Zhao L, Zhang Y, Wang Q, Zhang Y, Qu X. Preoperative Tim-3 expression on peripheral NK cells is correlated with pathologic TNM staging in colorectal cancer. Mol Med Rep. 2017;15(6):3810–3818. doi:10.3892/mmr.2017.6482.
28. Ip S, Da, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Ac A, Vk K, Osman I, Bhardwaj N. Reversal of NK-Cell Exhaustion in Advanced Melanoma by Tim-3 Blockade. Cancer Immunol Res. 2014 Feb 11. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0171.
29. Crome SQ, Nguyen LT, Lopez-Verges S, Yang SYC, Martin B, Yam JY, Johnson DJ, Nie J, Pniak M, Yen PH, et al. A distinct innate lymphoid cell population regulates tumor-associated T cells. Nat Med. 2017;23(3):368–375. doi: 10.1038/nm.4278.
30. Du N, Zhou J, Lin X, Zhang Y, Yang X, Wang Y, Shu Y. Differential activation of NK cells by influenza A pseudotype H5N1 and 1918 and 2009 pandemic H1N1 viruses. J Virol. 2010;84(15):7822–7831. doi:10.1128/JVI.00069-10.
31. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):715–727. doi:10.1038/nri1936.
32. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, M-C D-N, Alifano M, J-F R, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. Cancer Res. 2011;71(16):5412–5422. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4179.
33. Le Maux Chansac B, Moretta A, Vergnon I, Opolon P, Lécluse Y, Grunenwald D, Kubin M, Soria J-C, Chouaib S, Mami-Chouaib F. NK cells infiltrating a MHC class I-deficient lung adenocarcinoma display impaired cytotoxic activity toward autologous tumor cells associated with altered NK cell-triggering receptors. J Immunol. 2005. 175(9):5790–5798.
34. Carrega P, Morandi B, Costa R, Frumento G, Forte G, Altavilla G, Ratto GB, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. Cancer. 2008;112(4):863–875. doi:10.1002/cncr.23239.
35. Bruno A, Focaccetti C, Pagani A, Imperatori AS, Spagnoletti M, Rotolo N, Cantelmo AR, Franzi F, Capella C, Ferlazzo G, et al. The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer. Neoplasia N. Y. N.. 2013;15(2):133–142.
36. Grzywacz B, Kataria N, Verneris MR. CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. Leukemia. 2007;21(2):356–359. doi:10.1038/sj.leu.2404499.
37. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, Luo X, Cooley S, Verneris M, Walcheck B, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). Blood. 2013;121(18):3599–3608. doi: 10.1182/blood-2012-04-425397.

38. Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. Front Immunol. 2013;4:422. doi: 10.3389/fimmu.2013.00422.
39. Krzywinska E, Cornillon A, Allende-Vega N, Vo D-N, Rene C, Lu Z-Y, Pasero C, Olive D, Fegueux N, Ceballos P, et al. CD45 Isoform Profile Identifies Natural Killer (NK) Subsets with Differential Activity. PloS One. 2016;11(4):e0150434. doi: 10.1371/journal.pone.0150434.
40. Celis-Gutierrez J, Boyron M, Walzer T, Pandolfi PP, Jonjić S, Olive D, Dalod M, Vivier E, Nunès JA. Dok1 and Dok2 proteins regulate natural killer cell development and function. Embo J. 2014;33(17):1928–1940. doi:10.15252/embj.201387404.
41. Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemissen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. Leukemia. 2005;19(5):835–840. doi:10.1038/sj.leu.2403704.
42. Takahashi E, Kuranaga N, Satoh K, Habu Y, Shinomiya N, Asano T, Seki S, Hayakawa M. Induction of CD16+ CD56bright NK Cells with Antitumour Cytotoxicity not only from CD16− CD56bright NK Cells but also from CD16− CD56dim NK Cells. Scand J Immunol. 2007;65(2):126–138. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01883.x.
43. Mandelboim O, Porgador A. NKp46. Int J Biochem Cell Biol. 2001;33(12):1147–1150. doi:10.1016/S1357-2725(01)00078-4.
44. Glasner A, Levi A, Enk J, Isaacson B, Viukov S, Orlanski S, Scope A, Neuman T, Enk CD, Hanna JH, et al. NKp46 Receptor-Mediated Interferon-γ Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. Immunity. 2018;48(2):396–398. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.010.
45. Fend L, Rusakiewicz S, Adam J, Bastien B, Caignard A, Messaoudene M, Iribarren C, Cremer I, Marabelle A, Borg C, et al. Prognostic impact of the expression of NCR1 and NCR3 NK cell receptors and PD-L1 on advanced non-small cell lung cancer. Oncoimmunology. 2017;6(1):e1163456. doi: 10.1080/2162402X.2016.1163456.
46. Fregni G, Perier A, Pittari G, Jacobelli S, Sastre X, Gervois N, Allard M, Bercovici N, Avril MF, Caignard A. Unique functional status of natural killer cells in metastatic stage IV melanoma patients and its modulation by chemotherapy. Clin Cancer Res. 2011;17(9):2628–2637. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2084.
47. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(7):4120–4125. doi:10.1073/pnas.0730640100.
48. Pietra G, Manzini C, Rivara S, Vitale M, Cantoni C, Petretto A, Balsamo M, Conte R, Benelli R, Minghelli S, et al. Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity. Cancer Res. 2012;72(6):1407–1415. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2544.
49. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. Nature. 2002;419(6908):734–738. doi:10.1038/nature01112.
50. Salih HR, Rammensee H-G SA. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. J Immunol. 2002. 169(8):4098–4102.
51. Loyon R, Picard E, Mauvais O, Queiroz L, Mougey V, Pallandre J-R, Galaine J, Mercier-Letondal P, Kellerman G, Chaput N, et al. IL-21-Induced MHC Class II+ NK Cells Promote the Expansion of Human Uncommitted CD4+ Central Memory T Cells in a Macrophage Migration Inhibitory Factor-Dependent Manner. J Immunol. 2016;197(1):85–96. doi: 10.4049/jimmunol.1501147.
52. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. Nat Immunol. 2004;5(12):1260–1265. doi:10.1038/ni1138.
53. Godet Y, Fabre E, Dosset M, Lamuraglia M, Levionnois E, Ravel P, Benhamouda N, Cazes A, Le Pimpec-Barthes F, Gaugler B, et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. Clin Cancer Res. 2012;18(10):2943–2953. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3185.
54. Beziaud L, Mansi L, Ravel P, Marie-Joseph EL, Laheurte C, Rangan L, Bonnefoy F, Pallandre J-R, Boullerot L, Gamonet C, et al. Rapalogs Efficacy Relies on the Modulation of Antitumor T-cell Immunity. Cancer Res. 2016;76(14):4100–4112. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2452.
55. Kim S, François E, André T, Samalin E, Jary M, Hajbi FE, Baba-Hamed N, Pernot S, Kaminsky M-C, Bouché O, et al. Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil chemotherapy for metastatic or unresectable locally recurrent anal squamous cell carcinoma (Epitopes-HPV02): a multicentre, single-arm, phase 2 study. Lancet Oncol. 2018;19(8):1094–1106. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30321-8.
56. Wang S, Han X, Hu X, Wang X, Zhao L, Tang L, Feng Y, Wu D, Sun Y, Shi Y. Clinical significance of pretreatment plasma biomarkers in advanced non-small cell lung cancer patients. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 2014;430:63–70. doi: 10.1016/j.cca.2013.12.026.
57. Xu L, Huang Y, Tan L, Yu W, Chen D, Lu C, He J, Wu G, Liu X, Zhang Y. Increased Tim-3 expression in peripheral NK cells predicts a poorer prognosis and Tim-3 blockade improves NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma. Int Immunopharmacol. 2015;29(2):635–641. doi:10.1016/j.intimp.2015.09.017.
58. Laheurte C, Galaine J, Beziaud L, Dosset M, Kerzerho J, Jacquemard C, Gaugler B, Ferrand C, Dormoy A, Aubin F, et al. Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4(+) Th1 responses against telomerase in cancer patients. Oncoimmunology. 2016;5(5):e1137416. doi: 10.1080/2162402X.2015.1137416.

Annexe 5

IJC
International Journal of Cancer

Metronomic cyclophosphamide induces regulatory T cells depletion and PSA-specific T cells reactivation in patients with biochemical recurrent prostate cancer

Caroline Laheurte[1,2], Antoine Thiery-Vuillemin[3], Fabien Calcagno[3], Anna Legros[1,2], Harmonie Simonin[1,2], Laura Boullerot[1,2], Marion Jacquin[3], Thierry Nguyen[3], Guillaume Mouillet[3], Christophe Borg[1,3] and Olivier Adotévi[1,2,3]

[1]Université de Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Besançon, France
[2]Plateforme de BioMonitoring, Etablissement Français du sang Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France
[3]Department of Medical Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon, France

Biochemical recurrence (BCR) occurs in up to 40% of prostate cancer patients after prostatectomy. In our study, we performed an immune monitoring study in 20 prostate cancer patients with BCR previously treated with metronomic cyclophosphamide (mCTX). We observed a decrease of regulatory T cells (Tregs) from 2 months and this was more pronounced after 6 months of mCTX treatment. This drop of Tregs was associated with increased level of activated HLADR$^+$ CD45RO$^+$ T cells in peripheral blood. Furthermore, a reactivation of Th1 polarized anti-PSA T-cell response was detected in BCR patients treated with mCTX. However, dendritic cell subsets counts and activation were not influenced by the treatment. In the clinical setting, we found that PSA level control was observed in 82% (9/11) of patients with a significant diminution of Tregs after mCTX compared to 33% (3/9) in patients without Tregs decrease. In addition, 30% (6/20) of patients previously treated with mCTX remained free for androgen deprivation therapy. In conclusion, Tregs diminution and immune activation associated with PSA level control occurred after mCTX in prostate cancer patients with BCR.

Introduction

Prostate cancer is the second most common cancer in humans in males, worldwide. Patients with localized tumors benefit from curative treatment, however, 20–40% of these patients will relapse.[1] Biochemical recurrence is diagnosed by an increase of circulating level of prostate-specific antigen (PSA), whereas in most cases no tumor can be detected.[2–4] Patients with increased PSA after treatment of the primary tumor have an unfavorable prognosis.[5] New therapeutic approaches are therefore needed to delay the initiation of androgen deprivation treatment and/or to increase the overall survival of these patients.

In this context, the use of metronomic chemotherapy consisting of frequent anticancer drug administration at low doses may be of particular interest. Metronomic cyclophosphamide (mCTX) has been extensively evaluated as therapy in several human cancers.[6–8] Beyond anti-angiogenic activity when used at a low dose, cyclophosphamide is known to enhance immune response mainly by inducing regulatory T cells depletion, maturation of dendritic cells, leading to a reactivation of antitumor immunity.[7,9,10]

The mCTX has shown activity in metastatic prostate cancer setting.[8,11] We recently reported the first phase II clinical trial using mCTX to treat hormone-naïve patients with biochemical recurrent prostate cancer.[12] Thirty-eight patients were included and treated with daily dose of 50 mg mCTX for 6 months. We showed that 42% (16/38) patients experienced a decrease or a stabilization of PSA and the treatment was well tolerated. The median time until androgen deprivation therapy initiation was around 15 months. Here, we describe the immunomodulatory effects of mCTX therapy in prostate cancer patients in biochemical relapse.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Key words: metronomic cyclophosphamide, regulatory T cells, anti-PSA T-cell response, biochemical recurrence, prostate cancer

Abbreviations: ADT: androgen deprivation therapy; BCR: biochemical recurrence; CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; DC: dendritic cells; HLA: human leukocyte antigen; IFN-γ: interferon-γ; IL: interleukin; mCTX: metronomic cyclophosphamide; MDSC: myeloid-derived suppressor cells.; Mo: months; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; PBS: phosphate-buffered solution; PSA: prostate-specific antigen; TNF: tumor necrosis factor; Tregs: regulatory T cells; VEGF: vascular endothelial growth factor

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

Grant sponsor: Ligue Contre le Cancer, Conseil Regional de Franche Comté

DOI: 10.1002/ijc.32803

History: Received 27 Mar 2019; Accepted 12 Nov 2019; Online 20 Nov 2019

Correspondence to: Olivier Adotévi, E-mail: olivier.adotevi@univ-fcomte.fr

What's new?

Prostate cancer patients with biochemical relapse show an increase in the circulating level of prostate specific antigen (PSA) post-treatment. Metronomic chemotherapy consisting of frequent low-dose anticancer drug administration may be particularly beneficial in this context. Here, the authors evaluated the immunomodulatory effect of metronomic cyclophosphamide (mCTX) and its association with PSA control in prostate cancer patients with biochemical recurrence. mCTX mediated regulatory T-cell depletion, resulting in reversal of immunosuppression and the concurrent reactivation and resurgence of PSA-specific T cells. This specific T-cell activation led to lowering of PSA levels and control of disease progression, supporting the use of mCTX therapy.

Materials and Methods

Patients

A prospective single-arm phase II study was conducted between July 2006 and April 2013 in the University Hospital of Besançon (Besançon, France).[12] It explored the activity and safety of a short planned exposure of 6 months of metronomic cyclophosphamide administered orally at a daily dose of 50 mg. The treatment was supposed to be continued until a maximum of 6 months except in the case of unacceptable toxicity, disease progression or patient decision to stop therapy. The primary endpoint was PSA response. To be eligible, patients should have previously localized prostate cancer, with confirmed biochemical recurrence and should not receive androgen deprivation therapy (ADT). More details on study design are described in the original prior publication.[12]

The immunomodulation of metronomic cyclophosphamide was evaluated in 20 preselected men that finished 6 months of treatment (out of 38). Blood sample was collected before and after metronomic cyclophosphamide therapy (2 and 6 months). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and frozen until use. Blood cells were also collected from healthy donors from the Etablissement Français du Sang (EFS, Besançon, France), following EFS guidelines. All patients and healthy donors had given their written consent and the protocol was approved by local ethics committees and French national drug agencies.

Flow cytometry

Regulatory T cells (defined as $CD3^+CD4^+CD127^-CD25^+$ $FOXP3^+$), activated T cells ($HLADR^+$ and $CD45RO^+$) and Dendritic Cell populations were measured in thawed PBMCs using flow cytometry. PBMCs were thawed and incubated for 10 min at 4°C with fixable viability dye (eBioscience, San Diego, CA), and then for 30 min at 4°C with corresponding surface antibodies. For intracellular staining, FOXP-3, and CTLA-4, cells were fixed and permeabilized using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (00-5523-00, eBioscience), following the manufacturer's protocol. Tregs were analyzed according to $CD4^+CD127^-$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ cells. The decrease of Tregs is considered from a threshold of 20% decrease between the baseline and after treatment. Cells were acquired on a FACS CANTO II cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) using FACS Diva™ (BD Biosciences). A minimum of 5,000 CD4 T cells alive were acquired on Flow cytometer. All antibodies used are listed in a table in Supporting Information methods.

Assessment of PSA-specific T-cell responses

Prostate-specific T-cell responses were assessed by IFN-γ ELIspot or ELISA assay after a short-term *in vitro* stimulation of PBMC with PSA-derived peptides at 1 μg/ml (CTL, Germany) during 7 days as a method previously described.[13,14] After 6 days, the presence of specific T cells was measured by IFN-γ ELISpot assay, conducted according to the manufacturer's instructions (Diaclone, France). IFN-γ-secreting T-cells expressed as spot forming cells per 10^5 cells were counted using the C.T.L. Immunospot system. Responses were positive when IFN-γ spots number was both higher than 10 and more than two times the background. In some experiments, specific T-cell responses were evaluated by IL-2 and TNF-α production by ELISA assays according to the manufacturer's instructions (Diaclone, Besançon, France).

Statistics

Histograms are presented as mean with SEM. Statistical comparison between groups was based on nonparametric tests: Mann–Whitney test for group comparison and Wilcoxon matched-pairs for individual comparison of patients. Histograms are presented as mean with SEM. All analysis was performed using Prism software version 6 (Graph Pad Software, La Jolla, CA). Differences were considered statistically significant when p values were lower than 0.05.

Data availability

The data that support the findings of our study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Results

FoxP3 regulatory T cells depletion after metronomic cyclophosphamide is associated with PSA diminution and objective response

Regulatory T cells (Tregs) monitoring was performed by flow cytometry in peripheral blood of 20 prostate cancer patients with BCR at baseline, 2 and 6 months after mCTX and in healthy individuals as control (Fig. 1*a*). The baseline percentage of Tregs was 4.5% in BCR patients and was similar to healthy subjects (Supporting Information Fig. S1). We found that the percentage of Tregs significantly decreased after 6 months of

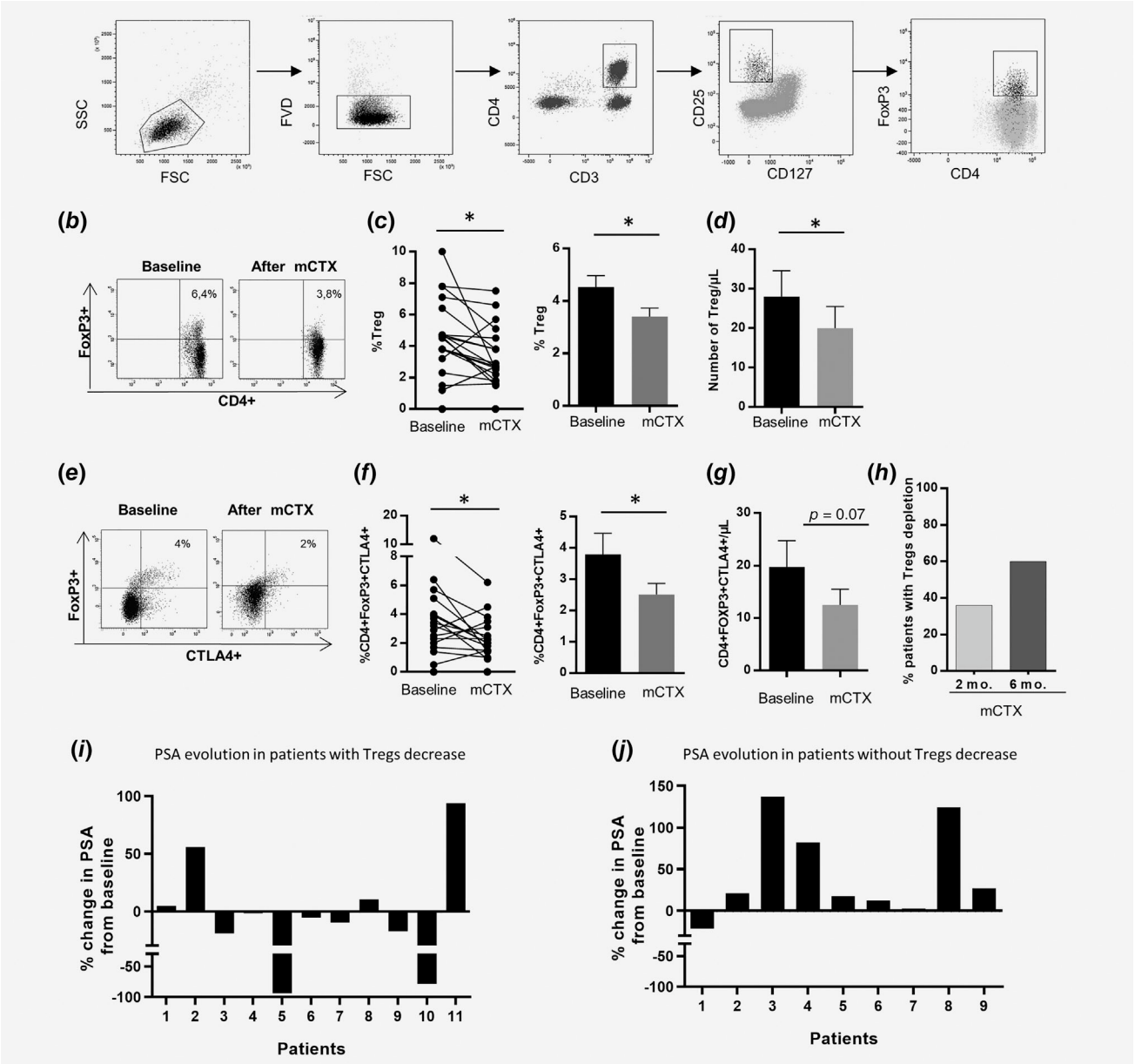


Figure 1. $CD4^+CD127^-CD25^+FoxP3^+$Tregs monitoring in prostate cancer patients in biochemical recurrence treated with mCTX. (*a*) Gating strategy of Tregs analysis ($CD3^+CD4^+$ $CD127^-CD25^+$ $FoxP3^+$). (*b*) Representative dot plots showing Tregs percentage before and after 6 months mCTX for one patient. The Tregs were done in % on CD4 T cells. (*c*) Tregs evolution in each patient (left) and mean ± SEM (right) at baseline and 6 months after mCTX ($n = 20$). (*d*) Absolute number of Tregs ($n = 13$). (*e*) Representative dot plots showing the level of CTLA4+ Tregs. (*f*) Evolution of CTLA4+ Tregs in each patient (left) and mean ± SEM (right) at baseline and 6 months after mCTX ($n = 16$). (*g*) Absolute number of CTLA4+ Tregs at baseline and after 6 months of mCTX ($n = 11$). (*h*) Frequency of patients exhibiting a decrease of Tregs percentage (›20%) at 2 and 6 months after mCTX. (*i*, j) Fold change of the PSA level from baseline to after 6 months of mCTX in patients with a decrease of Tregs ($n = 11$; *i*) or in patients without a decrease of Tregs ($n = 9$; *j*). *p ‹ 0.05.

mCTX, (mean 4.5 ± 2.2 *vs.* 3.4 ± 1.6%) (Figs. 1*b* and 1*c*). Consistently, mCTX also impacted the absolute number of Tregs ($p = 0.04$) while the CD4 T cells count was preserved after treatment (Fig. 1*d* and Supporting Information Fig. S1). Similar results were found when focusing on Tregs expressing CTLA-4, described as highly suppressive cells (Figs. 1*e*–1*g*). The Tregs diminution was observed after 2 months of mCTX in 35% (7/20) of patients compared to 55% (11/20) after 6 months suggesting a delayed effect of this treatment in the context of prostate cancer patients with BCR (Fig. 1*h*).

We observed a link between the Tregs modulation after mCTX, the PSA evolution and clinical outcome. PSA level control was mainly (82%, 9/11) observed in the group of patients showing a significant diminution of Tregs (at least

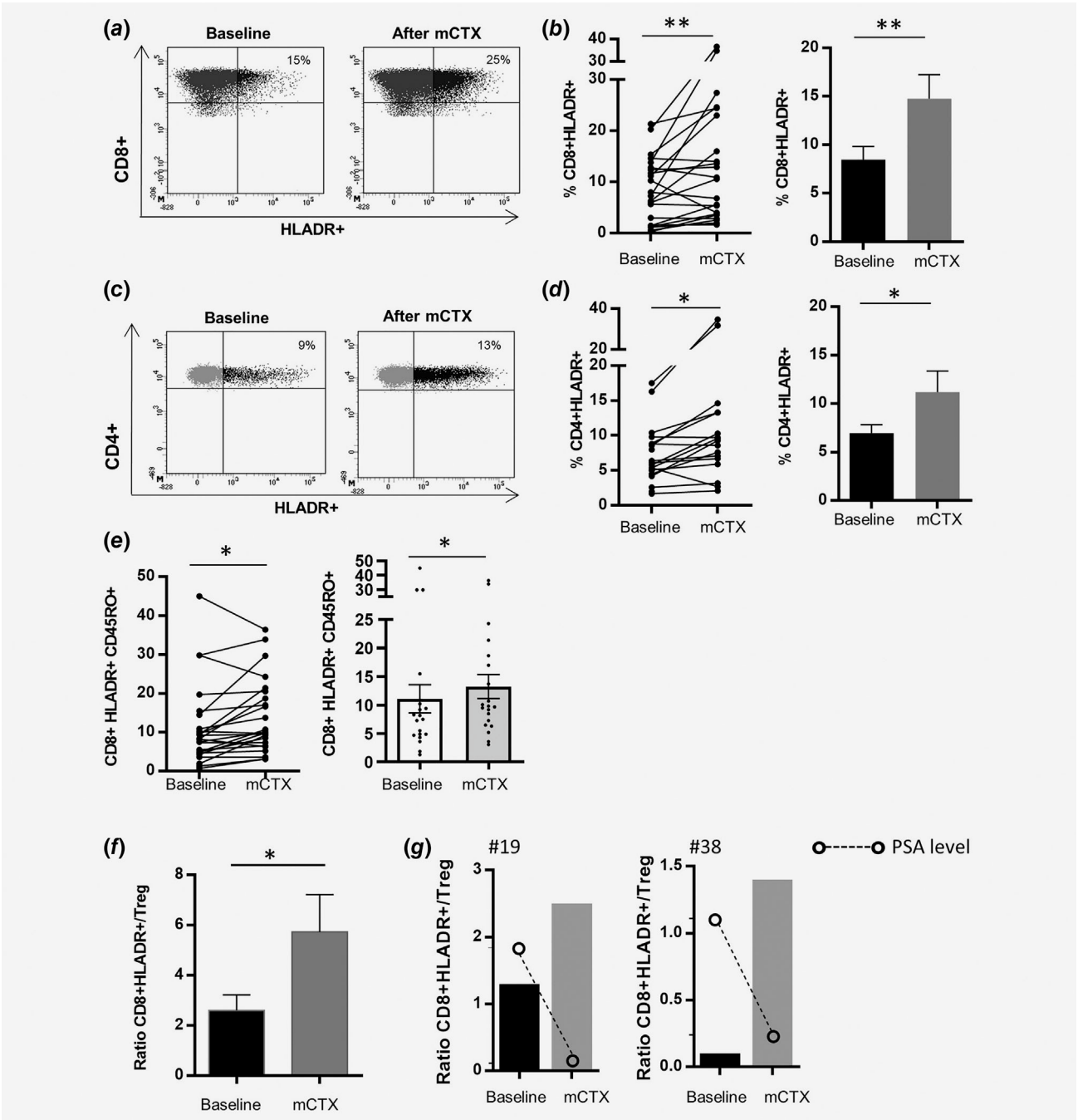


Figure 2. Effect of mCTX therapy on activated T cells. (*a*) Representative dot plots showing HLA-DR+ CD8 T cells before and after 6 months mCTX for one patient. (*b*) HLA-DR$^+$ CD8 T cells evolution in each patient (left) and mean ± SEM (right) at baseline and 6 months after mCTX (n = 19). (*c*) Representative dot plots showing HLA-DR$^+$ CD4 T cells before and after 6 months mCTX for one patient. (*d*) HLA-DR$^+$ CD4 T cells evolution in each patient (left) and mean ± SEM (right) at baseline and 6 months after mCTX (n = 19). (*e*) Percentage of HLADR$^+$ CD45RO$^+$ CD8 T cells in each patient (left) and mean ± SEM (right) at baseline and 6 months after mCTX (n = 19). (*f*) HLADR$^+$ CD8$^+$ T cells to CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ Tregs ratios (n = 19). (*g*) HLADR$^+$ CD8$^+$ T cells to CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ Tregs ratios in the two patients with objective biochemical responses (dotted lines represent PSA evolution). *p < 0.05; **p < 0.01.

20%) after mCTX compared to 33% (3/9) in patient without Tregs diminution (Figs. 1*i* and 1*j*, and Supporting Information Table S1). Notably, 6 out of 20 patients previously treated with mCTX remained free for androgen deprivation therapy and five of them belonged to the group of BCR patients with significant decrease of Tregs. Overall, the 5-years survival rate

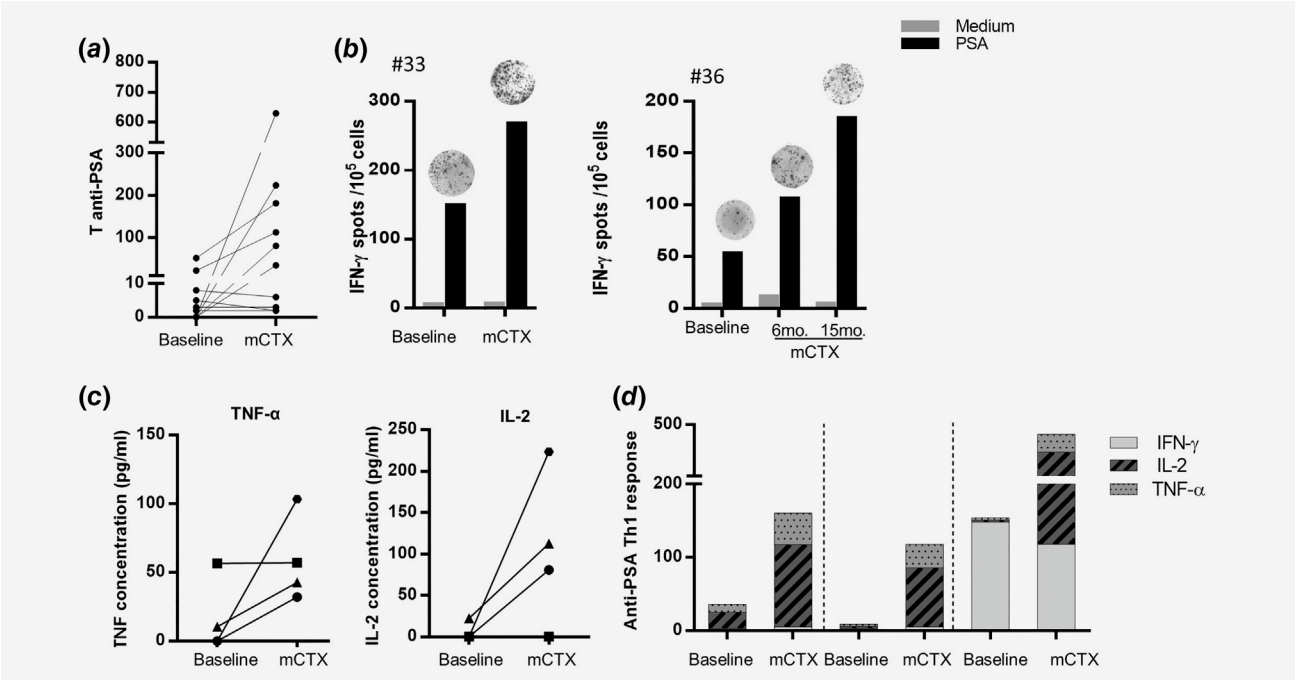


Figure 3. Anti-PSA Th1 responses after mCTX in prostate cancer patients in biochemical recurrence. (*a*) PSA-specific T-cell responses measured by IFN-γ ELISpot assay ($n = 10$). (*b*) Example of two patients. (*c*) TNF-α and IL-2 productions by PSA-specific T cells. (*d*) Polyfunctional T-cell responses against PSA after mCTX ($n = 3$).

was 95% in this population of prostate cancer with BCR previously treated with mCTX (Supporting Information Table S1).

Monitoring of activated T cells and dendritic cell subsets in BCR patients treated with metronomic cyclophosphamide

Next, we addressed whether Treg depletion during mCTX treatment leads to immune activation. As shown in Figure 2, the percentage of both activated CD8 and CD4 T cells expressing HLADR were highly increased in most patients after mCTX treatment (mean 8.5% ± 1.4 *vs.* 15% ± 2.5 and 7% ± 0.8 *vs.* 11% ± 2.1, respectively, $p < 0.05$; Figs. 2*a*–2*d*). Furthermore, mCTX is associated with a significant increase of $HLADR^+$ $CD45RO^+$ effector memory CD8 T cells in peripheral blood (Fig. 2*e*). Consequently, an increase of effector CD8 T cells to suppressor Treg ratio was observed in patients treated with mCTX (Fig. 2*f*). Furthermore, three patients with the best objective response after mCTX, exhibited a significant increase of activated CD8 T cells to Treg ratio (Fig. 2*g* and Supporting Information Table S1). In contrast no change of dendritic cells (DC) subsets count and activation status was observed in these patients after mCTX therapy (Supporting Information Fig. S2).

Induction of PSA-specific Th1 response after metronomic cyclophosphamide treatment

Th1 polarized CD4 T cells that produce IFN-γ, TNF-α and interleukin-2 are thought to be beneficial for antitumor immunity in several cancers.[15] Therefore, we assessed whether mCTX could also improve specific Th1 response against PSA by using ELIspot or ELISA after *in vitro* stimulation of PBMC with PSA-derived peptides. Metronomic CTX treatment led to specific increases or resurgence of anti-PSA T cells immunity in 6/10 patients (Figs. 3*a* and 3*b*). In one patient who received mCTX for more than 1 year, we detected a long-lasting anti-PSA T-cell response (Fig. 3*b*). In addition, we showed that mCTX induced anti-PSA polyfunctional T cells producing IFN-γ, TNF-α and IL-2 (Figs. 3*c* and 3*d*).

Collectively, mCTX therapy in prostate cancer patients in biological recurrence is associated with a Tregs depletion and potent reactivation of T-cell immunity against PSA in addition of PSA diminution.

Discussion

Immunomodulatory effect of metronomic cyclophosphamide (mCTX) is widely described in several cancers.[7,9,10] Here, we reported for the first time the immunological effects of mCTX in prostate cancer patients in biochemical relapse. We showed that mCTX mediated Tregs diminution resulting in the reversal of immunosuppression and a concurrent reactivation and resurgence of PSA-specific T-cell response. Furthermore, this immune activation was associated with PSA level control and better clinical outcome.

In this cohort of BCR, Tregs diminution occurred from 2 months but this drop was observed in most patients after 6 months suggesting a delayed effect of mCTX in this context. In previous studies, mCTX was commonly used to treat

patients with metastatic disease and the observed Treg decrease occurred early after mCTX (around 1 month). However, in these studies, the duration of mCTX treatment did not exceed 3 months.[9,16–19]

An amplification of activated-phenotype T cells was also observed in BCR patients after mCTX, leading to an increase of effector CD8 T cells to Tregs ratio. Interestingly, we are able to detect *de novo* anti-PSA T-cell responses after mCTX suggested that PSA produced by prostate cancer cells could be uptake by antigen-presenting cells and presented to T cells *in vivo*. The delayed Tregs diminution mediated by mCTX is also associated with the reactivation of pre-existing memory T cells against PSA. It has been reported that the withdrawal of immunosuppressive environment after mCTX contributes to adaptive T-cell activation, but also stimulate innate immunity such as NK cells, dendritic cells.[16,20] However, no change of dendritic cell subsets counts and activation state was observed in this cohort.

The mechanism of decrease of Tregs induced by mCTX treatment may rely on its anti-angiogenic effect.[6] Indeed, it is well known that pro-angiogenic factor such as VEGF secreted by the tumors promotes Tregs expansion.[21] For example, in metastatic prostate cancer patients, with higher level of VEGF than localized one,[22] the diminution of VEGF after mCTX could occur faster and then promoted a rapid drop of Tregs. In the context of BCR prostate cancer considered a localized disease, we speculate that this mechanism is probably longer to achieve in most patients and could also explain the delay (after 6 months) of immune reactivation observed in these patients. Based on these findings, a minimum duration of 6 months of mCTX would be required to sustain the immune activation induced by mCTX. However, even if mCTX treatment is commonly well tolerated, this treatment would not exceed 1 year in order to limit the risk of toxicity related to chronic exposure.[8]

After curative local therapy, biochemical recurrence is a mode of relapse of prostate cancer patients.[1] Recurrence is diagnosed by an increase in the level of circulating PSA whereas in most cases no tumor can be detected.[2] In this context, the standard of care consists of androgen deprivation therapy (ADT) which must be balanced with the toxicities associated with long term hormonotherapy.[23] Thus, new therapeutic approaches are needed to delay the initiation of ADT.

In this cohort, 95% of patients with BCR were still alive for more than 5 years and 30% of them remained free for ADT after mCTX. Interestingly, the patients with best objective clinical response presented an immune activation suggesting a link between the immune-mediated effect of mCTX and patient's clinical outcome.

Cumulative data suggest that prostate cancer is not considered as an immune-responsive tumor. Sipuleucel-T, the first cancer vaccine approved by the FDA in metastatic prostate cancer is not effective and its current use is very limited. Furthermore, the success of immune checkpoint inhibitors such as anti-PD-1/PD-L1 or anti-CTLA4 remains elusive in this indication.[24] This could be explained by several resistance mechanisms including a high immunosuppressive microenvironment (Tregs, MDSCs) driven by androgens. Indeed, androgens have been shown to exert inhibitory effect on innate and adaptive immune cells.[25] Furthermore, low T-cell infiltration, low PD-L1 expression, downregulation of MHC-I and low mutation burden are associated with prostate tumors. To counteract these immune resistance pathways, chemotherapy, radiotherapy or hormonal therapies could be combined with immunotherapies to improve their efficacy in prostate cancer.[24]

Thus, we believe that the anti-angiogenic and immune activation effects of mCTX in prostate cancer could create a suitable environment for immunotherapies action.

In our study, we showed that mCTX therapy stimulates anti-PSA immune responses leading to PSA level diminution and better clinical outcome and supports the use of mCTX therapy for BCR prostate cancer management.

Acknowledgements

We thank all patients who contributed to our study. We thank all of the medical doctors and nurses from Oncologic Department of University Hospital of Besançon for their contributions. The authors also thank the Biomonitoring platform of CIC-1431 for their technical support. This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer, the Conseil Regional de Franche-Comte.

References

1. Artibani W, Porcaro AB, De Marco V, et al. Management of biochemical recurrence after primary curative treatment for prostate cancer: a review. *Urol Int* 2018;100:251–62.
2. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, et al. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999;281:1591–7.
3. Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol* 2000;163:1632–42.
4. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2014;65:467–79.
5. Van den Broeck T, van den Bergh RCN, Arfi N, et al. Prognostic value of biochemical recurrence following treatment with curative intent for prostate cancer: a systematic review. *Eur Urol* 2018;75:967–87.
6. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:423–36.
7. Pasquier E, Kavallaris M, André N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:455–65.
8. André N, Carré M, Pasquier E. Metronomics: towards personalized chemotherapy? *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:413–31.
9. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:641–8.
10. Chen Y-L, Chang M-C, Cheng W-F. Metronomic chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Cancer Lett* 2017;400:282–92.
11. Nelius T, Rinard K, Filleur S. Oral/metronomic cyclophosphamide-based chemotherapy as option for patients with castration-refractory prostate cancer: review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2011;37:444–55.

12. Calcagno F, Mouillet G, Adotevi O, et al. Metronomic cyclophosphamide therapy in hormone-naive patients with non-metastatic biochemical recurrent prostate cancer: a phase II trial. *Med Oncol* 2016;33:89.
13. Beziaud L, Mansi L, Ravel P, et al. Rapalogs efficacy relies on the modulation of antitumor T-cell immunity. *Cancer Res* 2016;76:4100–12.
14. Laheurte C, Galaine J, Beziaud L, et al. Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4(+) Th1 responses against telomerase in cancer patients. *Oncoimmunology* 2016;5: e1137416.
15. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:298–306.
16. Ge Y, Domschke C, Stoiber N, et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:353–62.
17. Cornelissen R, Hegmans JPJJ, Maat APWM, et al. Extended tumor control after dendritic cell vaccination with low-dose cyclophosphamide as adjuvant treatment in patients with malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:1023–31.
18. Noguchi M, Moriya F, Koga N, et al. A randomized phase II clinical trial of personalized peptide vaccination with metronomic low-dose cyclophosphamide in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2016;65:151–60.
19. Huijts CM, Werter IM, Lougheed SM, et al. Dutch WIN-O consortium. Phase 1 study of everolimus and low-dose oral cyclophosphamide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2018;68:319–29.
20. Scurr M, Pembroke T, Bloom A, et al. Low-dose cyclophosphamide induces antitumor T-cell responses, which associate with survival in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:6771–80.
21. Terme M, Tartour E, Taieb J. VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology* 2013;2:e25156.
22. Li H, Kantoff PW, Ma J, et al. Prediagnostic plasma vascular endothelial growth factor levels and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1557–61.
23. Fakhrejahani F, Madan RA, Dahut WL. Management options for biochemically recurrent prostate cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2017; 18:26.
24. Boettcher AN, Usman A, Morgans A, et al. Past, current, and future of immunotherapies for prostate cancer. *Front Oncol* 2019;9:884.
25. Kissick HT, Sanda MG, Dunn LK, et al. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:9887–92.