

# Université Pierre et Marie Curie

Thèse de doctorat d'Immunologie

## **Approche Immunologie des Systèmes pour l'étude du microenvironnement tumoral et de l'interface fœto-maternelle**

**Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie**

Présentée par

**Djamel-Eddine NEHAR-BELAID**

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2014 devant un jury composé de :

Professeur **Adrien SIX**

Professeur **Eric TARTOUR**

Docteur **Vassili SOUMELIS**

Professeur **Marc BONNEVILLE**

Docteur **Nathalie CHAPUT**

Professeur **David KLATZMANN**

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Examinatrice**

**Directeur**



*Aux deux femmes de ma vie, a mia mamma e mia moglie ...*

*A Anes et Ritej ...*

*... L'étude de la nature suppose dans l'esprit deux qualités qui paraissent opposées : les grandes vues qui embrassent tout d'un coup d'œil et les petites attentions d'un instinct laborieux qui ne s'attachent qu'à un seul point.*

*Buffon, histoire naturelle, 1749*

## REMERCIEMENTS

### **Professeur David KLATZMANN, mon directeur de thèse**

David, vous m'avez accueilli au sein de votre laboratoire, vous avez cru en moi, vous m'avez soutenu. Je vous en serai toujours reconnaissant. J'ai été frappé par votre capacité à tirer le meilleur de chaque situation et de chacun, vous avez réussi à faire travailler ensemble des immunologistes, des médecins, des pharmaciens, des bio-informaticiens, des informaticiens, des statisticiens et j'en passe, ce savant mélange m'a permis de progresser. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je tiens à vous témoigner mon respect et mon admiration.

### **Professeur Adrien SIX**

Je tiens à sincèrement te remercier pour le précieux temps que tu as passé à me conseiller, évaluer mon travail et m'orienter. Pour ton humour, tes jeux de mots inégalables et surtout de m'avoir accepté et intégré au sein de ton équipe (je suis presque des vôtres). Je t'ai eu comme professeur d'immunologie à l'université, j'ai été captivé par tes enseignements qui m'ont donné envie de continuer à étudier l'immunologie qui me passionne et me passionnera toujours.

### **Rapporteurs**

#### **Professeur Eric TAROUR**

Merci pour le temps que vous avez passé à lire mon manuscrit. Vos remarques et suggestions m'ont permis de l'améliorer.

#### **Docteur Vassili SOUMELIS**

Je vous remercie pour le temps que vous m'avez accordé, j'ai beaucoup apprécié la discussion que l'on a eu concernant l'immunologie, le cancer et surtout la biologie des systèmes. Vos conseils m'ont motivé et aidé.

### **Examineurs**

#### **Professeur Marc BONNEVILLE et Docteur Nathalie CHAPUT**

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

### **Docteur Bertrand BELLIER**

Je me rappellerai toujours du coup de fil que tu m'as passé (un dimanche, si ma mémoire est bonne) pour me motiver à faire cette thèse, c'est en partie grâce à toi que j'ai rejoint le labo. Merci à toi.

### **Professeur Isabelle CREMER**

Vous m'avez motivé dans des moments difficiles, vous m'avez donné l'envie de continuer à y croire. Merci

### **Professeur Pierre YOUINOU (du CHU de Brest)**

Merci de m'avoir accueilli au sein de votre équipe alors que je n'étais qu'en deuxième année. C'est en partie grâce à vous que j'ai décidé de me lancer dans l'aventure de la recherche.

### **Docteur Claudine ANDRE, mon ancien chef de M1**

Merci pour tout ce que vous m'avez appris, j'ai été impressionné par votre passion pour la Science, vous m'avez toujours encouragé et soutenu.

### **Annick LIM**

Merci pour ton aide et soutien pendant les phases difficiles pendant mon séjour à Pasteur.

**Phongy phongo Hang Pham... le frère noichi.** Une rencontre entre deux cultures voire trois (tu es presque marocain maintenant !), une très belle rencontre qui m'aura marquée. Le docteur PHAM sait tout faire ou presque, être un très bon statisticien, jouer à l'informaticien, jouer à l'électricien, jouer à l'œnologue, jouer au réparateur de disque dur, jouer au correcteur de méthodologie qui n'en est pas une (n'en était pas une)... ce qu'il ne sait pas faire je ne le dirai pas (c'est ce qu'on appelle l'amitié). Je tiens à te remercier pour tout ce tu m'as apporté et wella j'ai pas bou.

On y va ?

**Wahiba CHARAA.** Ma voisine de bureau, celle qui a subit, mes idées, mes chants, mes présentations et surtout mes écrits (ça a commencé avec les mails et ça s'est terminé avec un pavé de 200 pages ... ).

Merci pour tout, j'ai appris pleins de choses en te côtoyant : R, Excel, le cinéma (et la réciproque est vraie, il ne faut pas déconner !!).

J'ai apprécié ton soutien, tes conseils souvent (pour ne pas dire toujours) judicieux, tes sauts d'humeurs et surtout ton côté « Dj Cut Killer de l'expression française... rira bien qui rigolera vers la fin !! ☺ ). J'ai une mauvaise nouvelle pour toi, je vais rester un petit moment au lab.

**Nicolas DŒérian**, un breton, un vrai ! enfin un réunionnais, un parisien ? je ne sais plus..

Moi : On va boire un verre ? Réponse de Nico : Un seulement ? (le côté breton)

Moi : J'aimerais lancé un GSEA stp ! Réponse : tu peux m'envoyer un mail et poser un post-it sur mon bureau, c'est pas que je ne t'aime pas, mais je risque d'oublier ☺ (Le côté réunionnais ?).

Nico, j'ai apprécié ta disponibilité, ton implication dans tous les projets qu'on a fait avancer ensemble, ton dynamisme, ta bonne humeur ...

Private Joke : ordi, métro, oublié.. (Ta meilleure performance, avec celle des lunettes au bar). J'espère que tu t'en souviens☺.

**Encarnita FERANDIZ-MARIOTTI.** Même en étant enceinte et pas au top de ta forme tu as relu jusqu'au bout mon manuscrit, tes remarques sont toujours judicieuses. Michel tient à te remercier pour tout (surtout pour le figeage de champs ☺).

PS. Si tu cherches un babysitter, je suis dispo ...

**Claude BERNARD.** Je tiens à te remercier pour ton soutien que ça soit au laboratoire ou en dehors. Tu m'as aidé à maintes reprises, je te suis reconnaissant. Grâce à toi j'ai pu lire tous « les canards », mon niveau en contrepètrie s'est nettement amélioré (J'en ai trouvé une pas graveleuse : La petite maison dans la prairie).

**Ioanis DRACOS**

ID : I have a theory : « you don't like democracy ! »

Me : « i agree with you, i prefer french system »

Thanks for alcohols, cakes ... and for natural selection courses

**Valentin Quiniou.** Pour ton humour, ta bonne humeur et ton optimisme. Tu seras celui qui aura réussi à avoir des RIN à plus de 7 à partir d'échantillons de pancréas (j'ai écrit ça le 25 août, aux dernières nouvelles tes RIN étaient à 5..). **Les autres personnes de Husson :** Véronique Thomas-Valin, Claire, Roberta ...

**Tristan COURAU.** Mon binôme de l'équipe cancer et de la dream team Science [Churlaud G et al, 2014, Cervi]. Toujours ~~chaud pour lancer~~ prêt pour lancer des manip qu'il trouve logique ou sinon il fait pas ... Ce fut un plaisir de travailler avec toi !

**Sophie Miller.** Pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton aide si précieuse. Je n'ose même pas imaginer ce que serait le labo si tu n'étais pas là.

**Dominique BELLE** de l'ED pour vos conseils et votre gentillesse.

**Les collègues du CERVI :** Gwladys (la meilleure d'entre nous), Fabien, Maria GR, Laura F, Thomas V, Béatrice LB, Guillaume C, Fadi, Loréna, Simond, Rachel, ... et ceux qui sont parti vers d'autres horizons (Yenkel, Audrey, Gaelle ..)

**Les personnes de la plateforme P3S Abiba, Cédric et Wassila**

Wassila tu m'as souvent arrangé, donné des conseils, orienté quand mes ARN étaient pas très beaux ☺ ... je tiens à sincèrement te remercier.

**Le personnel de l'animalerie :** Serban, Christelle, Kim ...

**Les amis**

-Le docteur Rajeb mon pote d'enfance, 25 ans d'amitié ou presque ... Tu ne sers presque à rien mais je t'aime quand même.

-Les autres amis d'enfance qui sont malheureusement loin de moi : Madjid le petit et Madjid le grand (j'espère que vous prenez bien soin de vos patients).

-ErrrPaolo (mon romain préféré, ma che davvero!), et sa copine Annie (merci pour les empanadas, ça tue !!). Au fait, la girafe elle court a combien de Km/heure ?

-Rayane et Sou, les bogoss ... Vivement des vacances méritées

Et pardon à ceux que j'ai oublié ...

**Ma famille**

Ma sœur d'amour, ta bonhomie m'impressionnera toujours ...

Mes Tata et spécialement ma Tata S qui m'a soutenu dans les moments difficiles ...

Ma mère adorée, tu m'as supporté, tu m'as soutenu, jamais je n'oublierai ... Tu es mon modèle.

**La Ettouil Family :** le beau papa, la belle maman, Mehdi, Aness, Imen et Nada ...

Ma petite italienne adorée, merci pour ton soutien quotidien pendant ma thèse, tu m'as écouté parler de mon projet en me faisant croire que tu comprenais tout.

# TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>Chapitre I. CELLULES TUMORALES ET SYSTEME IMMUNITAIRE : QUELS LIENS ?.....</b>	<b>10</b>
I. Les tumeurs : des cellules presque comme les autres .....	10
1. Comment une cellule « normale » se transforme-t-elle en cellule tumorale ? .....	10
2. Que différencie une cellule tumorale d'une cellule « normale » ? .....	10
3. Existe-t-il des antigènes spécifiques de tumeurs ? .....	12
a. Découverte .....	12
b. Classification des antigènes spécifiques de tumeurs.....	12
4. Le microenvironnement tumoral, acteur principal de la progression tumorale .....	14
c. Les fibroblastes tumoraux.....	14
d. Les cellules inflammatoires .....	15
Les TAM .....	15
Les neutrophiles.....	15
e. La matrice extra-cellulaire (MEC) .....	16
f. L'angiogenèse tumorale .....	16
II. Le système immunitaire est-il capable de « voir » les cellules tumorales ? .....	20
1. Les origines du combat, système immunitaire vs. cellules tumorales .....	20
2. Les cellules tumorales sont ignorées ? .....	20
a. Les tumeurs spontanées ne provoquent pas de résistance du système immunitaire .....	20
b. Implication de la faible immunogénicité ? .....	21
3. L'immuno-surveillance.....	22
a. Historique .....	22
b. La renaissance de l'immunosurveillance des cellules tumorales.....	22
c. Un triste constat... et des concepts .....	24
4. L'immuno-édition .....	25
a. Une immuno-surveillance améliorée... une histoire de <i>3E</i> .....	25
b. L'immuno-édition remise en question ... la tumeur serait elle tolérée ? .....	28
5. La tolérance... ..	29
a. Une immunosurveillance par les lymphocytes T régulateurs ? .....	29
La place des lymphocytes T régulateurs dans l'immunité anti-tumorale .....	29
Les années 60-70... Des cellules immunosuppressives .....	29
Les années 80... Une immuno-suppression tumorale par des cellules T .....	30
Les années 90... la « découverte » des Tregs .....	30
Les années 2000... enfin un marqueur .....	31
Tregs périphériques ou Tregs thymiques ? .....	31
Vers une conversion de novo des pTregs .....	32
Ou bien vers un recrutement des tTregs .....	32
Le combat Tregs vs Tconv ... une histoire de statut et de rapidité.....	33
Les évènements précoces de la réponse anti-tumorale .....	33

Les amTregs .....	34
III. Tolérance Foeto-maternelle vs Cancer... même combat ? .....	37
1. Le fœtus ... Une greffe allo-génique tolérée ! .....	37
a. Les années 1950-1960... la tolérance.....	37
b. Les années 70-80... entre rejet et facilitation .....	37
Une facilitation humorale : des anticorps masquant les antigènes paternels ?.....	37
Une facilitation au travers de facteurs inhibiteurs du rejet ? .....	38
Une facilitation cellulaire : des cellules suppressives protégeant le fœtus ? .....	38
c. Les années 90 ... .....	38
d. Les années 2000... les Tregs s’emmêlent.....	39
2. Fœtus toléré, cellules tumorales protégées ... une histoire d’(allo-)antigènes.....	39
IV. Problématique & hypothèse de travail.....	40
<b>Chapitre II. : L’IMMUNOLOGIE DES SYSTEMES POUR L’ETUDE DU</b>	
<b>MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....</b>	<b>42</b>
I. Le système immunitaire... un système complexe .....	42
1. Un système.....	42
2. ...Complexe.....	42
II. Comment aborder ce système complexe ? .....	43
1. La note ou le violon... l’approche réductionniste.....	43
a. Qu’est-ce que le réductionnisme ? .....	43
b. L’approche réductionniste ne suffit plus .....	43
2. Ou plutôt la symphonie... l’approche systémique.....	44
a. Biologie systémique... Des concepts historiques.....	44
b. L’émergence d’une nouvelle discipline.....	45
c. LA BIOLOGIE des Systèmes vs. L’IMMUNOLOGIE des Systèmes.....	47
d. L’approche systémique du point de vue de la littérature.....	47
Une approche systémique pour l’étude de la littérature concernant le biologie des systèmes	
.....	47
L’approche Immunologie des Systèmes ... Oui, mais comment? .....	48
3. L’orchestre au complet, ça sonne mieux... complémentarité .....	48
III. L’immunologie des systèmes pour l’étude du microenvironnement tumoral.....	52
<b>II. FOUILLE DE DONNEES : METHODOLOGIE ET STRATEGIE D’ANALYSE.....</b>	<b>53</b>
<b>Chapitre I. METHODOLOGIE.....</b>	<b>53</b>
I. L’approche transcriptomique.....	53
1. Une méthode... plusieurs techniques.....	53
2. Les puces à ADN .....	54
a. Principe de la technologie .....	54
b. Les micro-puces Illumina .....	54
3. L’approche transcriptome... ou comment étudier plus de 30 000 gènes simultanément .....	54
II. Traitement des données brutes .....	55

1.	Contrôle qualité .....	55
2.	Normaliser ... pour comparer .....	55
3.	Filtrer... Pour éliminer les parasites.....	57
4.	La variabilité, un facteur crucial ... Contrôle qualité.....	57
a.	L'ACP ... ou comment réduire les dimensions.....	57
b.	PVCA ... ou comment identifier les sources de variabilité.....	58
III.	Méthodes d'analyse des données transcriptomiques .....	60
1.	Analyse différentielle ... Gènes différentiellement exprimés (GDE).....	60
c.	Les tests non paramétriques .....	60
d.	Les tests paramétriques.....	60
2.	Classification des profils d'expression.....	61
a.	Méthodes supervisées .....	61
b.	Méthodes non supervisées.....	61
3.	Comment se servir des signatures moléculaires ?.....	63
a.	Utiliser des signatures issues de la littérature .....	63
b.	Ou générer de nouvelles signatures spécifiques... ICA → GSEA.....	63
	ICA ... Ou comment extraire des signatures moléculaires .....	64
	Origines .....	64
	Application aux données transcriptomiques.....	64
	Facteurs limitants .....	65
	GSEA ... La signature X permet-elle de distinguer les conditions A et B ?.....	65
IV.	Annotation fonctionnelle des données transcriptomiques .....	67
1.	Comment annoter les GDE ?.....	67
a.	Annotation manuelle .....	67
b.	Annotation automatisée.....	67
	Bases de données.....	67
	Gene Ontology (GO) .....	68
	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).....	68
	Outil d'annotation.....	70
	L'outil d'annotation utilisant la base GO.....	70
	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (David) .....	70
	Ingenuity Pathways Analysis (IPA).....	70
2.	Comment annoter les signatures moléculaires ? .....	71
a.	Analyse individuelle ... signature par signatures .....	71
b.	Analyse globale ... réseaux fonctionnels .....	71
c.	Qu'elles sont les fonctionnalités de Cytoscape ? .....	71
	Comment ça marche ?.....	71
	Enrichment map.....	72
	Autres plug-ins intéressants.....	73
3.	Complémentarité GDE / Signatures.....	74
<b>Chapitre II.</b>	<b>STRATEGIE D'ANALYSE.....</b>	<b>75</b>

I. Etape I : Emettre des hypothèses.....	75
II. Etape II : Générer des GDE & signatures.....	75
III. Etape III : (Pré-) Traitement des données .....	76
IV. Etape IV : Annoter.....	76
V. Etape V : proposer de potentielles molécules cibles.....	77
VI. Etape VI : Valider ces molécules cibles potentielles .....	77
VII. Etape VII : On est reparti pour un tour .....	77
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>79</b>
<b>Chapitre I. Etude du Microenvironnement tumoral .....</b>	<b>80</b>
I. Modèle B16-WT.....	81
1. Protocole expérimental.....	81
2. Analyse des jeux de données .....	81
3. GDE au niveau du microenvironnement tumoral.....	82
a. Analyse descriptive .....	82
b. Annotation fonctionnelle .....	83
4. Les signatures moléculaires.....	88
a. Analyse descriptive .....	88
b. Réseau de modules fonctionnels de signatures.....	89
5. PCR quantitative.....	89
6. Conclusions de l'étude .....	91
II. Modèle B16 : WT vs VEGF/TGF $\beta$ .....	92
1. Génération des lignées tumorales B16-shVEGF et B16-shTGF $\beta$ .....	92
2. Croissance tumorale des différentes tumeurs .....	92
3. GDE au niveau microenvironnement tumoral .....	93
a. Analyse descriptive .....	93
b. Annotation fonctionnelle .....	94
4. Signatures moléculaires.....	98
a. Analyse descriptive .....	98
b. Réseau de modules fonctionnels.....	99
c. Enrichissement en signatures immunologique parmi les signatures générées ?.....	101
5. Conclusions de l'étude .....	102
III. Modèle AB1-HA .....	103
1. GDE au niveau des ganglions .....	103
a. Analyse descriptive .....	103
b. Annotation fonctionnelle .....	104
2. GDE au niveau du microenvironnement tumoral.....	106
a. Analyse descriptive .....	106
b. Annotation fonctionnelle .....	106
3. Signatures au niveau du microenvironnement tumoral.....	108

a.	Analyse descriptive .....	108
b.	Réseau de modules fonctionnels de signatures .....	109
4.	Conclusions de l'étude .....	113
<b>Chapitre II. Etude transcriptomique comparative de l'interface foeto-maternelle (IFM) et du microenvironnement tumoral .....</b>		<b>114</b>
I.	Analyse transcriptomique de l'interface foeto-maternelle.....	114
1.	Protocole expérimental.....	114
2.	Contrôle qualité .....	114
3.	GDE au niveau de l'IFM.....	117
a.	Analyse descriptive .....	117
b.	Annotation fonctionnelle .....	118
4.	Signatures moléculaires au niveau de l'IFM.....	120
a.	Analyse descriptive .....	120
b.	Réseau de modules fonctionnels de signatures .....	121
II.	Comparaison IFM vs Microenvironnement tumoral.....	123
1.	Comparaison des GDE.....	123
2.	Comparaison des signatures moléculaires .....	124
a.	Signatures issues des bases de données.....	124
b.	Signatures issues de ICA : ND036 (B16-WT) et ND038 (IFM) .....	128
	Similarité entre les signatures ... Jaccard-GoSemSim .....	128
	Fort Jaccard-Fort GSS.....	128
3.	Conclusions de l'étude .....	131
<b>IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>132</b>
<b>Chapitre I. Le microenvironnement sous la loupe de l'Immunologie des systèmes..</b>		<b>132</b>
I.	Pourquoi l'approche systémique ? .....	132
II.	Pourquoi utiliser des signatures et ne pas se contenter des gènes ?.....	132
1.	Quel est l'intérêt d'utiliser des signatures ? .....	132
2.	Des signatures générées par hasard ?.....	133
3.	Pourquoi ICA pour l'extraction des signatures ? .....	133
4.	Les signatures comme biomarqueur .....	134
III.	Maths-Bioinformatiques-Biologie .....	135
<b>Chapitre II. L'immunogénicité des tumeurs... un facteur crucial .....</b>		<b>135</b>
I.	Immunogénicité des tumeurs.....	135
II.	AB1 vs. B16... Un modèle, un profil d'expression .....	136
III.	Immunogénicité et tolérance.....	138
IV.	La théorie des 3E (immuno-édition) revisitée .....	140
<b>Chapitre III. Immunothérapies &amp; cancer .....</b>		<b>142</b>
I.	Immunothérapies du cancer .....	142
1.	Immunothérapie non spécifique .....	142

2.	Immunothérapie passive .....	142
3.	Immunothérapie active .....	143
4.	Thérapie cellulaire adoptive (ACT).....	143
5.	Immunothérapies combinatoires .....	144
a.	Pourquoi éteindre le TGF $\beta$ et VEGF ? .....	144
b.	Un retard de croissance T-dépendant ?.....	145
c.	Le basculement Down $\rightarrow$ Up.....	147
II.	Immunothérapies ciblant les Tregs.....	148
1.	Comment supprimer les cellules suppressives ? .....	148
a.	Eliminer « physiquement » les Tregs.....	148
b.	Supprimer la suppression .....	148
III.	Les effets potentiellement délétères des immunothérapies.....	149
1.	Rupture de tolérance.....	149
2.	Propagation de déterminants antigéniques.....	149
IV.	La contribution de l'Immunologie des systèmes dans les immunothérapies .....	150
<b>Chapitre IV. Fœtus, cellules tumorales... même combat ?.....</b>		<b>151</b>
I.	Comparer une tumeur à un fœtus...socialement choquant mais biologiquement factuel	151
1.	Des voies de signalisation en commun.....	151
a.	Des gènes en commun.....	151
b.	Des signatures communes.....	154
2.	Des voies de signalisation spécifiques.....	155
II.	Les cellules Tregs protègent les tumeurs... et le fœtus .....	156
<b>V. REFERENCES .....</b>		<b>161</b>
<b>VI. ARTICLE 3 Nehar-Belaid et al, soumis.....</b>		<b>184</b>
<b>VII. LISTE DES TABLEAUX .....</b>		<b>212</b>
<b>VIII. TABLE DES FIGURES .....</b>		<b>213</b>

# I. INTRODUCTION

## Chapitre I. CELLULES TUMORALES ET SYSTEME IMMUNITAIRE : QUELS LIENS ?

### I. Les tumeurs : des cellules presque comme les autres

#### 1. Comment une cellule « normale » se transforme-t-elle en cellule tumorale ?

Suite à des successions d'altérations génétiques ou mutations, les gènes impliqués dans les mécanismes de division cellulaire acquièrent la capacité d'induire un déséquilibre entre stimulation et inhibition de la prolifération cellulaire et par conséquent de transformer les cellules « normales » en cellules tumorales, c'est ce qu'on appelle le processus de cancérogenèse ou tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2000). La cancérogenèse est un processus multi-étapes résultant principalement de (i) l'activation anormale des gènes qui stimulent la division cellulaire, les proto-oncogènes tels que ras, Bcl2, C-myc, HER2, (ii) l'inactivation anormale des gènes qui inhibent la division cellulaire, les gènes suppresseurs de tumeurs comme p53, Rb, WT1, (iii) l'inactivation anormale des gènes de maintien de l'intégrité et de réparation de l'ADN (msh2, msh6...).

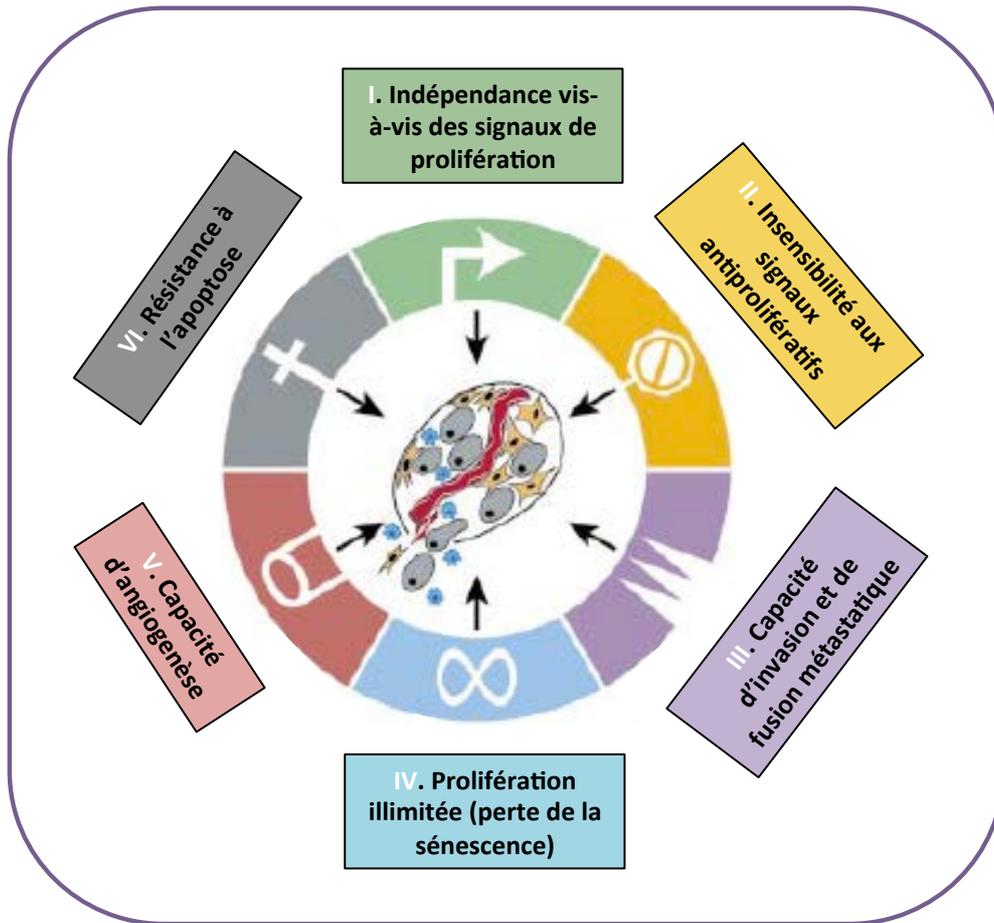
Le phénotype cancéreux résulte donc de l'action conjointe de plusieurs gènes et le cancer lui-même résultera de l'acquisition de mutations supplémentaires dans un ou plusieurs clones cellulaires d'un tissu particulier.

#### 2. Que différencie une cellule tumorale d'une cellule « normale » ?

Comme le décrivent *Hanahan et Weinberg* (Hanahan and Weinberg, 2011) les cellules tumorales sont caractérisées par au moins six propriétés intrinsèques.

- I)- Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération
- II)- Insensibilité aux signaux antiprolifératifs
- III)- Capacité d'invasion et de fusion métastatique
- IV)- Prolifération illimitée (perte de la sénescence ou immortalité)
- V)- Capacité d'angiogenèse
- VI)- Résistance à l'apoptose

Pour acquérir ces six propriétés, la cellule tumorale doit franchir de multiples barrières de défense anti-tumorale de l'organisme. A ces six caractéristiques intrinsèques vient se rajouter une propriété extrinsèque : un microenvironnement tumoral inflammatoire. Le rôle du microenvironnement sera discuté en détails dans la partie I-4 (Koebel et al., 2007).



**Figure 1. Les caractéristiques des cellules tumorales.**

En plus de ces six caractéristiques, l'échappement à l'immunosurveillance a été proposé comme une septième propriété intrinsèque des cellules tumorales (Dunn et al., 2004a), (Zitvogel et al., 2006).

*Figure adaptée de (Hanahan and Weinberg, 2000)*

### 3. Existe-t-il des antigènes spécifiques de tumeurs ?

Un peptide est dit antigénique lorsqu'il est reconnu comme étranger par l'organisme. Il est immunogène lorsque cette reconnaissance se traduit par une réponse immunitaire efficace. L'instabilité génétique des cellules tumorales les conduit à exprimer des antigènes absents des cellules dont elles dérivent. Les cellules tumorales seraient donc en quelque sorte des cellules « normales - presque comme les autres » exprimant à la fois des antigènes normaux (leur côté « normal ») et des antigènes tumoraux (leur côté « presque comme les autres »). La quête de ces antigènes a préoccupé les immunologistes du cancer pendant plusieurs décennies.

#### a. Découverte

Il aura fallu attendre les années 1950 et les progrès dans le domaine de l'immunologie pour argumenter l'existence de ces antigènes tumoraux. D'abord, *Medawar et al* observèrent une destruction de tumeurs transplantées dans des souris mais cette vaccination fut plus attribuée au rejet du non-soi inhérent à allogreffe qu'à l'implication d'un rejet tumoral (Medawar, 1944). Par la suite, en 1957, *Richmond Prehn* et *Joan Main* mirent en évidence que des tumeurs induites par un carcinogène chimique le MethylChlorAnthrene (MCA) chez la souris, pouvaient déclencher une réponse immunitaire permettant un rejet des tumeurs après ré-administration du carcinogène chimique (Prehn and Main, 1957). Ces observations démontrent alors l'existence d'antigènes tumoraux spécifiques.

Finalement, c'est l'identification et la caractérisation moléculaire du premier antigène tumoral chez l'homme par le groupe de *Thierry Boon* de l'Institut Ludwig à Bruxelles, au début des années 1990 qui a constitué une étape décisive pour l'immunologie des tumeurs.

Les antigènes tumoraux reconnus par les cellules immunitaires sont des petits peptides de huit à dix acides aminés qui sont apprêtés dans la cellule tumorale à partir de protéines surexprimées et parfois mutées. Ces peptides, présentés à la surface de la cellule tumorale par les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), sont reconnus par les lymphocytes T qui sont alors susceptibles d'éliminer les cellules tumorales.

#### b. Classification des antigènes spécifiques de tumeurs

À la suite du travail pionnier du Professeur *Boon* et ses collègues, des centaines d'antigènes associés aux tumeurs et reconnus par le système immunitaire ont été isolés. Certains sont à l'étude pour leur potentiel thérapeutique. Ils sont aujourd'hui classés en cinq grands groupes :

i) Des mutations peuvent altérées certaines protéines comme p53 ou la cycline kinase 4 (CDK4) qui joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire (Wölfel et al., 1995), ou encore la  $\beta$ -caténine, une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire (Robbins et al.,

1996).

ii) Les antigènes de différenciation, sont des antigènes exprimés dans un tissu donné aussi bien par des cellules normales que par les cellules tumorales correspondantes. tels que Melan-A/MART-1 (Kawakami et al., 1994), gp100 (Skipper et al., 1996) ou encore tyrosinase (Brichard et al., 1996). Ces antigènes sont de potentiels cibles en immune-thérapie.

iii) D'autres antigènes peuvent être surexprimés (Her-2/neu) (Disis et al., 1994a), (Disis et al., 1994b) ou bien ré-exprimés par la tumeur (antigènes fœtaux) (von Kleist and Burtin, 1969). A cause de leur expression d'antigènes anormaux, ces antigènes devraient être reconnus par les cellules immunitaires.

*Les antigènes du groupe « cancer/testis » ou « cancer/testicules, CTA »* tels que MAGE, BAGE, GAGGE (van der Bruggen et al., 1991), ou encore NY-ESO (Chen et al., 1997) sont des antigènes exprimés spécifiquement par le tissu tumoral en dehors d'une expression ectopique par les cellules germinales. Ces antigènes partagés par plusieurs mélanomes sont des bons candidats pour le développement de vaccins anti-tumoraux.

v) *Les antigènes dérivés d'agents pathogènes* : 15 à 20 % des cancers seraient associés à des agents pathogènes, notamment des virus (papillomavirus et cancers du col de l'utérus ou des voies aérodigestives supérieures, virus des hépatites B et C et cancers du foie), mais également des bactéries (*Helicobacter pylori* et cancer de l'estomac) ou des parasites (schistosome et cancer de la vessie) chez l'homme. (Young and Rickinson, 2004). Les vaccins contre ces antigènes ont aujourd'hui les résultats les plus efficaces en thérapie.

Depuis l'identification des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur, le cancer fut considéré comme une maladie des gènes (Weinberg, 1991); (Marshall, 1991). Cependant, certains arguments expérimentaux ont montré que la théorie selon laquelle le cancer serait uniquement dû à l'accumulation de mutations au niveau de l'ADN était une simplification excessive du problème. En effet, **Deng et al** ont démontré que des cellules, qui au cours du temps, ont accumulé des mutations, potentiellement oncogéniques, se retrouvent dans des tissus tout à fait sains (Deng et al., 1996). De plus, **Jonason et al** ont décrit une population de kératinocytes non cancéreux bien que préprogrammés -du fait de leurs mutations- à prendre part à la carcinogenèse (Jonason et al., 1996).

Ces deux études mettent en exergue, qu'en plus des propriétés intrinsèques des cellules tumorales, acquises au cours de l'accumulation de mutations, il existe d'autres facteurs, tel que le microenvironnement tumoral qui peut intervenir dans le phénomène de progression des cellules tumorales.

#### **4. Le microenvironnement tumoral, acteur principal de la progression tumorale**

De nombreuses études plaident en faveur de l'implication du microenvironnement tumoral. En 1984, *Dolberg et Bissell* ont mis en évidence que le potentiel oncogénique des cellules transformées par le virus du sarcome de Rous est inhibé lorsque l'on les injecte dans des embryons de poulet (Dolberg and Bissell, 1984). Plus tard, Il a été montré que le phénotype néoplasique pouvait être reversé lorsque les cellules tumorales étaient placées dans un environnement « normal » (McCullough et al., 1998). Ces travaux et d'autres suggèrent que le microenvironnement joue un rôle déterminant dans la progression tumorale mais aussi le processus d'oncogenèse. En effet, il est désormais admis que le caractère invasif d'un cancer est déterminé non seulement par le génotype des cellules tumorales (propriétés intrinsèques), mais aussi par leurs interactions avec l'environnement extracellulaire qui module les capacités de développement de la tumeur (propriété extrinsèque). Une tumeur ne peut croître toute seule et les cellules cancéreuses qui la composent ne peuvent être réduites à de simples amas de cellules isolées résidant dans un organe particulier. Elles forment bel et bien une structure complexe intégrée dans un environnement comprenant de la matrice extra cellulaire et d'une composante cellulaire constituée de divers types cellulaires (Noël and Foidart, 1998). La progression tumorale est donc le résultat d'un dialogue réciproque et dynamique entre les cellules tumorales et cette composante du microenvironnement qui les entoure (Mueller and Fusenig, 2004).

En plus des cellules tumorales, le microenvironnement comprend : les fibroblastes tumoraux, les cellules inflammatoires, La matrice extra-cellulaire (MEC) et les vaisseaux sanguins.

##### **c. Les fibroblastes tumoraux**

Les fibroblastes sont la composante cellulaire majoritaire du microenvironnement tumoral. Ils sont enveloppés par la MEC dont ils sont largement responsables de la synthèse de cette dernière. Ils sont également sources de protéases pouvant dégrader la matrice extracellulaire créant ainsi une libération de facteurs de croissance comme le bFGF (basic fibroblast growth factor), le TGF-  $\beta$  (transforming growth factor), le PDGF (platelet derived growth factor), l'EGF (epidermal growth factor). Les MMPs (métalloprotéases) matricielles exprimées par les fibroblastes peuvent également activer des formes latentes de facteurs de croissance et d'autres protéases par clivage protéolytique, ce qui conduit à un remodelage de la matrice extracellulaire (Simian et al., 2001)

Comme l'indique la (Figure 2), A l'état normal, le stroma de la plupart des organes est constitué d'un nombre minimal de fibroblastes associés à une MEC physiologique (Rønnov-Jessen et al., 1996). Lors de la progression tumoral une fois le stroma est activé, le nombre de

ces fibroblastes augmente et ces cellules vont subir une modification de leur phénotype qui se traduit par l'expression dans la MEC de nombreuses protéines telles que l'  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), de la vimentine, de la desmine et de la FAP (fibroblast activated protein) (Garin-Chesa et al., 1990). Avec ces marqueurs, les fibroblastes se transforment en ce qu'on appelle les myofibroblastes. En effet, Sappino ont mis en évidence dans le cancer du sein, que 80% des fibroblastes se transforment en myofibroblastes (Sappino et al., 1988). De plus, Le TGF- $\beta$  ainsi que le PDGF (facteurs sécrétés entre autres par les cellules tumorales) semblent être les principaux acteurs de cette modification de phénotype des cellules fibroblastiques résidentes (Lewis et al., 2004).

#### **d. Les cellules inflammatoires**

L'opulence des cellules inflammatoires et immunes au sein des tissus et des tumeurs fut constatée au milieu du dix-neuvième siècle par de nombreux pathologistes (Wiseman and Werb, 2002). En effet, en 1850, *Virchow* a été le premier à décrire qu'en condition chronique l'inflammation tendait à promouvoir la carcinogenèse. Depuis, ce concept a été validé par de nombreuses études et les types cellulaires participant à ces processus ont été identifiés.

##### ***Les TAM***

Parmi les cellules retrouvées dans le microenvironnement tumoral, les macrophages associés aux tumeurs (ou TAM pour Tumor Associated Macrophages) représentent le composant inflammatoire majoritaire du stroma. En effet, de nombreuses études cliniques ont démontré une association étroite entre le nombre des TAM et le mauvais pronostic des patients, pour divers cancers (sein, prostate, colon et col de l'utérus) (Leek et al., 1996), (Bingle et al., 2002). Comme un signe de l'extrême complexité de la biologie de ces cellules, une polarisation M1/M2 a été décrite. Les M1 correspondent aux TAM avec des fonctions pro-inflammatoires (expression d'IL1, IL6, IL12 CCL5...) alors que les M2 aux TAM avec des capacités immuno-régulatrices et réparatrices (expression d'IL10, CCL16, CCL18 ..) (Mantovani et al., 2002)

##### ***Les neutrophiles***

Les neutrophiles représentent 50 à 70% des leucocytes circulants. Ces cellules infiltrent la tumeur, ils sont recrutés précocement au cours de l'inflammation et sont considérés comme des effecteurs de l'immunité innée, mais leur rôle dans l'immunité anti-tumorale a longtemps été débattu. Aujourd'hui, l'implication de ces cellules dans les réponses anti-tumorale est quasiment admise. En effet, *Bellocque et al* ont rapporté une infiltration neutrophilique associée à un mauvais pronostic, dans une étude réalisée chez des patients atteints de cancers

bronchiques de type broncho-alvéolaire (Bellocq et al., 1998). De plus, l'élimination des neutrophiles à l'aide d'anticorps anti-Gr-1, déclenche une inhibition de la croissance tumorale (Pekarek et al., 1995) et limite les métastases (Tazawa et al., 2003).

A l'image de la polarisation M1/M2 des TAM, *Fridlender et al.* ont suggéré une polarisation des neutrophiles associés aux tumeurs en N1 et N2. Les N1 auraient un effet anti-tumoral (via le MPP-8, Fas, Ros ou encore l'ADCC), tandis que les N2 auraient un effet pro-tumoral (via MPP-9, la suppression, activation d'AKT ...) (Fridlender et al., 2009). En définitive, bien que sous-estimées et très peu étudiées, ces cellules jouent un rôle primordial dans l'immunité anti-tumorale (Fridlender and Albelda, 2012).

### ***Les lymphocytes***

Le rôle du système immunitaire adaptatif via les lymphocytes effecteurs et suppresseurs dans l'immunité anti-tumorale est crucial et sera présenté en détail dans la partie II.

#### **e. La matrice extra-cellulaire (MEC)**

Longtemps réduite à une structure passive servant de soutien ou d'ancrage des cellules, elle joue un rôle actif à travers des signaux envoyés aux cellules qui y résident. En effet, la MEC module le comportement des cellules par le biais d'activation de cascades de signalisation par l'intermédiaire de récepteurs d'adhérence ou alors en régulant l'accès à certaines molécules qui la composent (Lanigan et al., 2007). De nombreux facteurs sont également présents dans la MEC et sont libérés au cours de son remodelage, comme par exemple, IGF (insulin-like growth factor), le TGF $\beta$  ou encore le FGF (Lanigan et al., 2007). Cette MEC activée par le biais de son remodelage est à l'origine d'une augmentation de l'invasion des cellules tumorales. En effet, lorsque la MEC, issue de glande mammaire qui involue, est isolée et co-injectée avec des cellules tumorales mammaires, on observe davantage de métastases, avec un taux plus élevé d'angiogenèse tumorale. Lorsque cette même expérience est réalisée avec de la MEC de glande mammaire de rates nullipares, le phénomène est inhibé (McDaniel et al., 2006).

#### **f. L'angiogenèse tumorale**

L'angiogenèse est le processus permettant la mise en place d'un réseau de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Risau and Flamme, 1995). Lors de la progression tumorale, une forte vascularisation est nécessaire pour assurer l'apport des nutriments et de l'oxygène aux tissus. Le processus d'angiogenèse est finement contrôlé par une balance des facteurs anti-angiogéniques comme les interféron (IFN)  $\alpha$  et  $\beta$  et les

interleukines (IL) 10 (IL10) et 12 (IL12) et pro-angiogéniques tels que le VEGF, le VEGF-R, l'EGF, le PDGF, le TGF- $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , les métalloprotéases, l'IL1 et l'IL6.

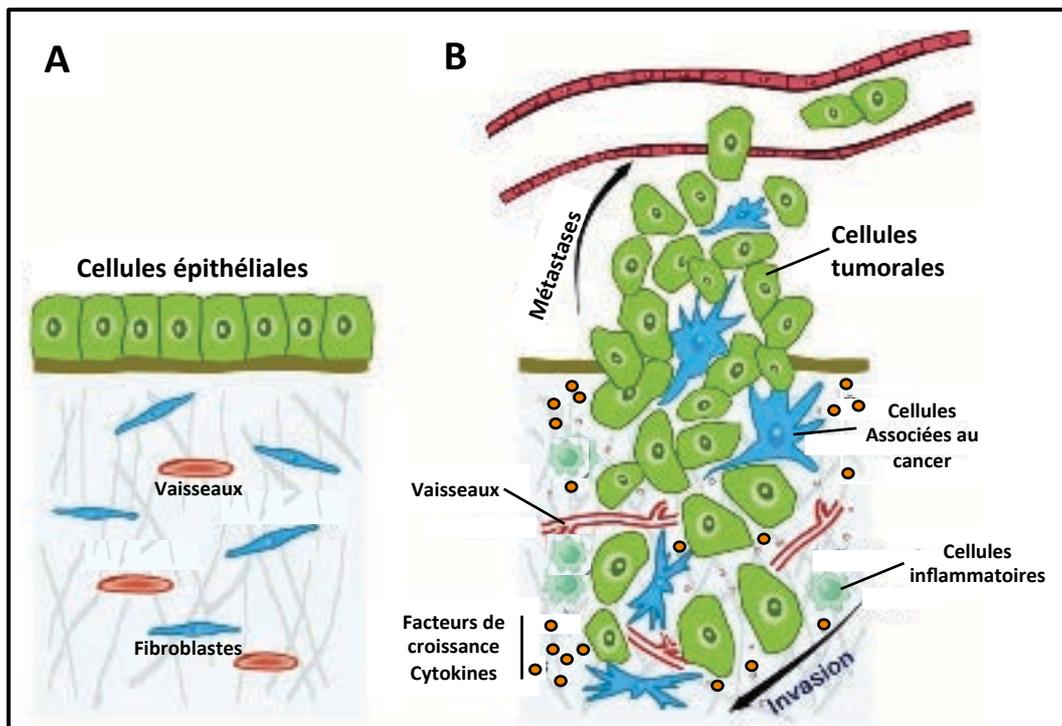
Dès le début des années 70, **Judah Folkman**, le père de l'angiogenèse moderne, affirma que la croissance tumorale et le développement des métastases dépendaient du processus d'angiogenèse. Il postula également que la néo-angiogenèse tumorale repose sur un « switch angiogénique », événement majeur dans le développement d'une tumeur. Dès ce moment, réprimer l'angiogenèse apparaît très naturellement comme une nouvelle stratégie thérapeutique anti-tumorale qui repose sur le fait d'affamer le tissu cancéreux en le privant de sa nourriture. Ainsi **Folkman**, introduit dès 1971 le premier concept de thérapie ciblée (Folkman, 1996), (Folkman, 1971).

Pendant la décennie 2000-2010 avec l'avènement de nouveaux inhibiteurs et activateurs de l'angiogenèse de nombreuses études modulant les voies de signalisation de l'angiogenèse ont vu le jour. Cela a abouti à la première démonstration du bénéfice d'un traitement anti-angiogénique dans le cancer. En effet, un anticorps monoclonal anti-VEGF, le *bevacizumab*, allonge la survie de patients atteints de cancers colorectaux métastasés (Hurwitz et al., 2004). De plus, l'utilisation d'anticorps dirigés contre le VEGF se révèle être efficace pour le traitement de plusieurs cancers, et notamment, les cancers colorectaux (Pernot et al., 2014). Plus récemment, **Terme et al** ont mis en évidence que des anticorps bloquants la voie de signalisation VEGF $\alpha$ -VEGFR permettaient d'inhiber la prolifération des cellules T suppressives (qui « protègent » les cellules tumorales) dans le cancer colorectal (Terme et al., 2013).

L'activation des cellules immunitaires (essentiellement les lymphocytes T et B) présentes au niveau du microenvironnement devrait permettre une réponse efficace aboutissant à l'élimination de la cellule tumorale. Cependant l'efficacité de cette réponse dépend de nombreux facteurs. D'une part, il est indispensable que la cellule tumorale exprime à sa surface, un antigène qui puisse déclencher la réponse, même si la plupart des tumeurs sont faiblement immunogènes. D'autre part, il se peut que le microenvironnement tumoral ne soit pas propice au développement d'une réponse immunitaire efficace.

En définitive, au vu de tous ces éléments, il apparaît évident que les cellules tumorales ne sont pas des amas de cellules isolées mais en étroite interaction avec un microenvironnement. Ces interactions sont finement régulées à la fois par les cellules composant ce microenvironnement et par les cellules tumorales. A ce système complexe se rajoute la composante immunologique qui joue un rôle crucial. En effet, le microenvironnement tumoral

est en constante interaction avec le système immunitaire de l'hôte et ces interactions sont caractérisées par une grande complexité qui ne sera pas évidente à aborder.



**Figure 2. Comparaison entre le stroma à l'état normal et un microenvironnement tumoral.**

A l'état normal (A), le stroma contient un nombre minimal de fibroblastes en association avec une matrice extracellulaire physiologique. Lors de la progression tumorale, le stroma est profondément modifié, c'est ce qu'on appelle le microenvironnement tumoral (B). Ce microenvironnement est un système complexe composé de cellules tumorales, de cellules immunitaires, des composants du stroma tels que les fibroblastes et une vascularisation complexe. Tous ces éléments tendent à interagir entre eux, ce qui donne lieu à des régulations à différents niveaux et rend l'étude de ce système difficile.

*Adaptée de Zhang and Liu, 2013*

## II. Le système immunitaire est-il capable de « voir » les cellules tumorales ?

### 1. Les origines du combat, système immunitaire vs. cellules tumorales

L'immunité anti-tumorale se caractérise par une histoire riche en rebondissements qui prend ses racines au 19<sup>ème</sup> siècle lorsqu'un chirurgien du Memorial Hospital de New York, **William B. Coley**, mis en évidence la régression de tumeurs chez des malades développant parallèlement un épisode infectieux (infection bactérienne). Après avoir réalisé que d'autres pionniers de la médecine, notamment **Louis Pasteur**, **Robert Koch** et **Emil Von Behring** avaient eux aussi observé une régression du développement tumoral concomitante à l'infection bactérienne, **Coley** eu l'idée d'injecter un mélange de bactéries inactivées, appelés depuis «toxines de Coley», à un patient présentant un stade avancé de la maladie. Cette première tentative de « vaccination » aboutit à une régression tumorale complète et à la survie du patient plus de 25 ans. Ce n'est que 20 ans plus tard que la théorisation de ces travaux fut proposée, notamment avec l'avènement de la théorie de l'immuno-surveillance de **Paul Ehrlich** qui sera discutée plus tard.

### 2. Les cellules tumorales sont ignorées ?

#### a. Les tumeurs spontanées ne provoquent pas de résistance du système immunitaire

En 1976, **Harold B. Hewitt** et ses collaborateurs ont montré, dans 27 modèles de tumeurs murines spontanées (leucémies, carcinomes, sarcome), que le transfert de lymphocytes issus de souris porteuses de tumeurs n'induit aucune trace de « résistance » du système immunitaire des souris réceptrices. Ils ont ainsi remis en question les modèles de tumeurs induites de plusieurs études en expliquant que le système immunitaire ne réagissait pas aux tumeurs injectées mais aux probables artefacts dus aux virus ou carcinogènes chimiques induisant la tumeur. La conclusion de leur étude a été que seules les tumeurs spontanées (en absence de toute intervention expérimentale) étaient appropriées pour tirer des conclusions potentiellement applicables en clinique (Hewitt et al., 1976). Cette étude a suscité de nombreuses réactions et notamment des partisans des immunothérapies comme **Herbert J. Rapp** qui a vivement critiqué l'article de **Hewitt** dans une lettre envoyée en 1978 à Cancer Research (Rapp, 1979).

En 1977, une autre étude réalisée par **George et Eva Klein** du Karolinska institute, a souligné le fait que les tumeurs spontanées n'étaient pas rejetées contrairement aux tumeurs induites (Klein and Klein, 1977) apportant en quelque sorte une validation des observations de **Hewitt**.

Plus récemment, de nombreux mécanismes décrivant la capacité des cellules tumorales à mettre en place des mécanismes de répression de la présentation antigénique ont été décrits. Par exemple, *Jaffee et al* (Marincola et al., 2000) ont mis en évidence un mécanisme de plasticité antigénique consistant en la délétion des molécules antigéniques à la surface des cellules tumorales ou en l'absence d'expression des voies de signalisation reliés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I, par exemple défaut de TAP1/2) (Seliger et al., 1997).

Ces observations semblent indiquer que la présence d'antigènes à la surface des tumeurs n'est pas liée à la transformation tumorale. Ces antigènes seraient alors soit d'origine virale, soit induits par les carcinogènes. En effet, le MCA est non seulement cancérigène mais aussi mutagène (Weisburger and Williams, 1981). La transformation tumorale et l'acquisition d'antigènes pourraient donc être deux événements indépendants qui se produisent dans la même cellule. Les résultats obtenus avec les tumeurs expérimentales ne devraient donc pas s'appliquer à la majorité des tumeurs humaines.

#### **b. Implication de la faible immunogénicité ?**

Afin de résoudre l'énigme des lignées tumorales ignorées par le système immunitaire, le professeur *Thierry Boon* et ses collaborateurs ont démontré que ces tumeurs spontanées, incapables d'induire une réponse immunitaire, peuvent être traitées *in vitro* par un mutagène ce qui permet l'obtention de cellules variantes, porteuses d'antigènes très puissants qui ont été baptisées « tum<sup>+</sup> », (Van Pel et al., 1983). Ces cellules variantes, « tum<sup>+</sup> », une fois injectées dans des souris, déclenchent de fortes réponses immunitaires permettant le rejet complet de la tumeur. En outre, les souris ayant rejeté ces cellules variantes deviennent capables d'éliminer également la cellule tumorale initiale. La conclusion de leur étude a été que les cellules tumorales non ou peu immunogènes portent un antigène trop faible pour déclencher une réponse immunitaire mais qui peut servir de cible à une réponse immunitaire préalablement induite.

Il est maintenant admis que le système immunitaire n'ignore pas les cellules tumorales, car le non-rejet de la tumeur ne signifie pas que le système immunitaire ne les voit pas. En effet, ce non-rejet peut être expliqué par le fait que le système immunitaire considère les tumeurs spontanées (utilisées par *Hewitt*) comme étant des cellules du soi car elles dérivent de cellules « normales », c'est le phénomène de tolérance dominante, qui sera abordé plus loin dans la partie II-5.

### 3. L'immuno-surveillance

#### a. Historique

Le concept selon lequel le système immunitaire pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales a d'abord été proposé par *Paul Ehrlich* (prix Nobel de Médecine 1908) au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Ehrlich, 1909).

Cinquante ans plus tard, ce concept a été repris par *Frank Macfarlane Burnet* (prix Nobel de Médecine 1960) et *Lewis Thomas* et formellement introduit en tant que théorie de l'immuno-surveillance des tumeurs (Burnet, 1970). En effet, *Burnet* et *Thomas* avaient prédit que les lymphocytes étaient responsables de l'élimination des cellules néo-transformées (en cellules tumorales). Cependant, lors du passage au stade expérimental de cette prédiction en utilisant des souris immuno-déficientes (NUDE), les résultats n'ont pas été convaincants. Avec le recul, les expériences réalisées par *Burnet* et *Thomas* peuvent être discutées : (i) il est maintenant admis que l'utilisation des souris NUDE comme modèle de souris immuno-déficientes est discutable du fait de la présence de faibles quantités de cellules T  $\alpha/\beta$  (Maleckar and Sherman, 1987), (Ikehara et al., 1984) (ii) les cellules NK sont encore présentes dans ce modèle et fonctionnent normalement (Herberman and Holden, 1978), or on sait maintenant que ces cellules jouent un rôle dans l'immuno-surveillance au travers de l'immunité innée. Ainsi, un système immunitaire avec un versant adaptatif résiduel (cellules T  $\alpha/\beta$ ) en présence d'un versant inné fonctionnel peut tout à fait conférer aux souris NUDE la capacité de mettre en place une immuno-surveillance des cellules tumorales. De plus, les expériences de Stutman ont été réalisées avec des lignées de souris de fond génétique CBA/ exprimant l'isoforme la plus active de l'enzyme aryl hydroxylase nécessaire au métabolisme du MCA. Outre l'immunité résiduelle de ces souris, l'échec de ces expériences peut aussi s'expliquer par la présence de cette isoforme particulière chez ces souris (Dunn et al., 2004a). Dans les années 1970 et suite aux résultats décevants obtenus par *Stutman* qui a utilisé un modèle de tumeurs induites par le MCA (Stutman, 1979), (Stutman, 1973) la théorie de l'immuno-surveillance des cellules tumorales fut mise aux oubliettes.

#### b. La renaissance de l'immunosurveillance des cellules tumorales

Durant les années 1990, la théorie de l'immuno-surveillance a eu le droit à une deuxième vie. En effet, plusieurs études ont relancé le débat concernant cette théorie.

i. **Les études concernant le rôle de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )** : Il a été montré que l'IFN- $\gamma$  endogène, protège l'hôte contre la croissance de tumeurs injectées ainsi que contre la formation de tumeurs spontanées et chimio-induites (Dighe et al., 1994). De plus, il a été

montré que des cellules tumorales de type fibrosarcomas croissent beaucoup plus rapidement dans des souris traitées avec des anticorps anti-IFN- $\gamma$  (Kaplan et al., 1998, Street et al., 2001).

ii. **Les études concernant les souris invalidées pour la perforine (pfp<sup>-/-</sup>)** : Comparées aux souris normales, les souris pfp<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles aux tumeurs induites par le MCA ainsi qu'à l'apparition de tumeurs spontanées (van den Broek et al., 1996), (Smyth et al., 2000). La perforine est un composant des granules cytotoxiques des cellules T et NK, elle joue un rôle primordial dans la cytotoxicité lymphocytaire (Russell and Ley, 2002). Ces expériences ont pu démontrer que la croissance tumorale chez la souris est contrôlée par des composantes immunologiques et ont permis la publication de nombreux travaux à ce sujet comme le montre le Tableau 1.

Souche de souris	Déficit immunitaire	Incidence de cancers
<i>Rag2</i> <sup>-/-</sup>	Absence de LT, LB et NKT	↗ Sarcomes induits par le MCA ↗ Cancers intestinaux et pulmonaires spontanés
<i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup>	Absence de LT $\gamma\delta$	↗ Sarcomes induits par le MCA
<i>Tcrb</i> <sup>-/-</sup>	Absence de LT $\alpha\beta$	↗ Tumeurs cutanées induites par DMBA/TRA
<i><math>\alpha</math> asialo-GM1</i>	Élimination des cellules NK	↗ Sarcomes induits par le MCA
<i>Cd1d</i> <sup>-/-</sup>	Absence de LT dépendant du CD1d	
<i>Ja18</i> <sup>-/-</sup>	Absence de NKT invariants	
<i>CD11</i> <sup>-/-</sup> <i>IL5</i> <sup>-/-</sup>	Absence d'éosinophiles	
<i>Ifngrr1</i> <sup>-/-</sup>	Insensible à l'IFN- $\gamma$	
<i>Ifngrr1</i> <sup>-/-</sup> ou <i>Ifngrr2</i> <sup>-/-</sup>	Pas de réponse à l'IFN- $\alpha$ et l'IFN- $\beta$	
<i>Pfp</i> <sup>-/-</sup>	Absence de perforine	↗ Sarcomes induits par le MCA ↗ Lymphomes B spontanés
<i>Ifng</i> <sup>-/-</sup>	Absence d'IFN- $\gamma$	↗ Sarcomes induits par le MCA ↗ Lymphomes induits par le MNU ↗ Lymphomes(C57Bl6) et adénocarcinome pulmonaires (Balb/c) spontané
<i>IL12<math>\alpha</math></i> <sup>-/-</sup>	Absence l'IL12	↗ Lymphomes induits par le MNU ↗ Tumeurs cutanées induites par DMBA/TRA
<i>Cd80</i> <sup>-/-</sup> ou <i>Cd86</i> <sup>-/-</sup>	Absence de CD80 et CD86	↗ Cancer de la peau induits par les UV

**Tableau 1. Incidence de cancers induits ou spontanés chez des souris présentant différents déficits immunitaires.**

(MCA : méthylcholantène ; DMBA/TPA : 7,12 diméthylbenz(a)anthracène /12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate ; MNU : N-Méthyl-Nnitrosourea ; NK : cellules Natural Killer)

Adapté de (Vesely et al., 2011)

Enfin, la démonstration que le système immunitaire est capable de « voir » les cellules tumorales et donc de l'existence d'une immuno-surveillance dépendante de l'IFN- $\gamma$  et des lymphocytes a été admise grâce aux travaux de l'équipe de **Robert Schreiber**. En effet, les souris déficientes pour les gènes RAG (Recombination Activating Gene), qui sont essentiels pour la génération des récepteurs spécifiques d'antigènes exprimés par les lymphocytes, présentent un blocage complet de la différenciation lymphoïde au stade précoce du développement (pas de lymphocytes B, T ou NKT fonctionnels) et présentent une fréquence accrue de tumeurs spontanées et de tumeurs induites par comparaison à des souris immunocompétentes (Shankaran et al., 2001).

Chez l'Homme, plusieurs arguments épidémiologiques et cliniques plaident pour une immuno-surveillance : (i) effet GVL (greffon versus leucémie), (ii) régressions tumorales spontanées associées à une réponse immunitaire (Escudier, 2012) (iii) corrélation entre la présence d'un infiltrat immunitaire et le bon pronostic clinique des tumeurs.

L'échappement à l'immuno-surveillance a été considéré par la suite, comme étant la septième propriété intrinsèque des cellules tumorales (Dunn et al., 2004b).

### **c. Un triste constat... et des concepts**

Malgré l'existence d'un processus fonctionnel d'immuno-surveillance des cellules cancéreuses, des sujets immunocompétents continuent à développer tous types de cancers. Cette triste réalité clinique suggère que les cellules tumorales useraient de « ruses » afin d'échapper à cette surveillance.

- On peut penser que vont être sélectionnées les cellules tumorales les moins visibles, les moins immunogènes et donc les moins potentiellement éliminables par le système immunitaire. Cette théorie va être discutée dans la partie II-4.

- On peut aussi croire que les cellules tumorales induisent un environnement tolérogène médié par des cellules suppressives, ce qui aurait pour conséquence d'empêcher le système immunitaire de « voir » les tumeurs comme un danger potentiel et donc de les détruire. Cette hypothèse sera à son tour discutée (partie II-5).

- On peut donc se demander si finalement, ces deux concepts ne sont pas conciliables voire compatibles car étroitement liés. En effet, le système immunitaire en sélectionnant les cellules tumorales les moins immunogènes. Ces dernières vont être perçues comme étant des cellules normales (du soi) qui vont donc induire une tolérance assurant leur protection contre les attaques du système immunitaire.

## 4. L'immuno-édition

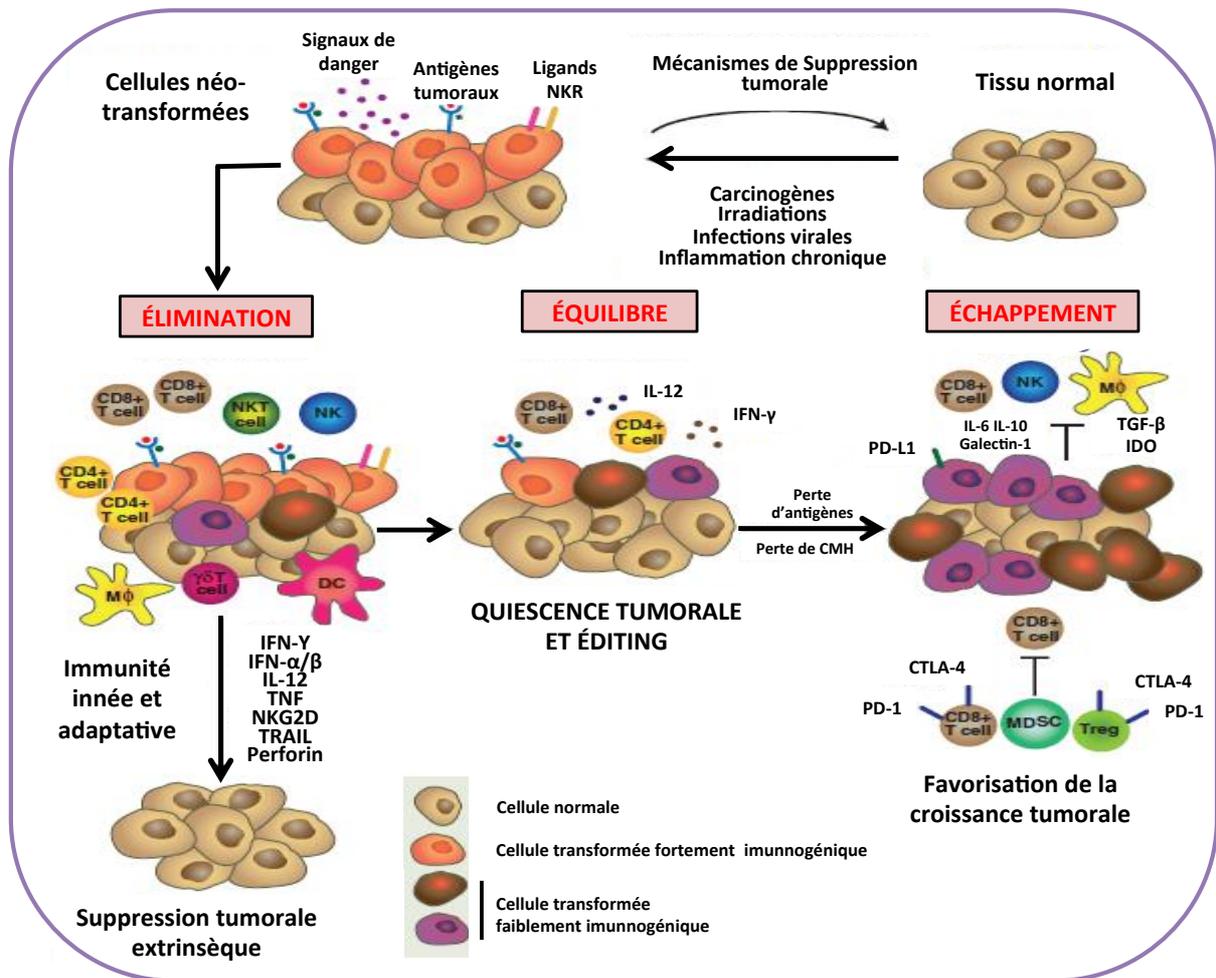
### a. Une immuno-surveillance améliorée... une histoire de 3E

Il a longtemps été pensé que l'immuno-surveillance permettait la protection de l'hôte au niveau des stades précoces de la transformation tumorale. A présent, il apparaît de plus en plus clair, qu'en plus de ce rôle protecteur, il existe un rôle « d'édition » ou « de sculpture » de l'immunogénicité d'éventuelles tumeurs se développant. Afin de décrire ce double rôle du système immunitaire (protecteur + éditeur), le terme d'immuno-édition a été proposé par le Professeur **Robert D. Schreiber** et ses collègues dans une revue de grande qualité (Dunn et al., 2004b).

L'immuno-édition (ou immuno-sélection) est définie par la sélection de variants non immunogènes des cellules tumorales (Zitvogel et al., 2006), elle est constituée par 3 étapes l'*Elimination*, l'*Equilibre* et l'*Echappement*.

Cette théorie fut baptisée la théorie des 3E et stipule que l'interaction entre le système immunitaire et la cellule tumorale peut conduire à : (i) l'*Elimination* des cellules tumorales, (ii) un état d'*Equilibre* c'est à dire que le système immunitaire va maîtriser la prolifération des cellules tumorales sans pour autant les éradiquer, ou à (iii) un *Echappement* de la cellule tumorale au contrôle immunologique. Cette dernière phase est la seule cliniquement visible, ce qui conduit à penser que le système immunitaire est devenu inefficace pour contrôler la croissance tumorale (Figure 3).

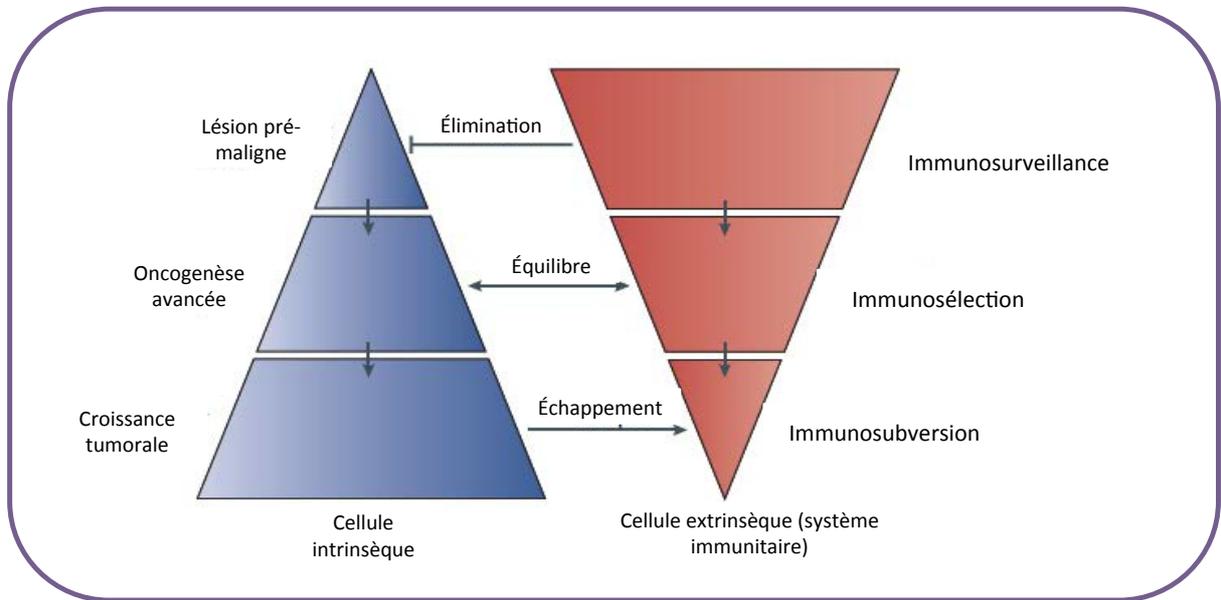
L'échappement à l'immunosurveillance a été proposé comme une septième propriété intrinsèque des cellules tumorales (Figure 4).



**Figure 3. Concept d'immuno-édition (Théorie des 3E)**

Selon la théorie des 3E, précocement lors de l'émergence des cellules cancéreuses, des signaux de danger comme les IFN de type I ou encore des molécules de surface vont stimuler les versants innés et adaptatifs du système immunitaire avec pour objectif de détecter et éradiquer la tumeur avant qu'elle ne devienne cliniquement décelable (c'est la phase d'élimination). Des variants cellulaires ayant survécu à la phase d'élimination vont rentrer dans la phase d'équilibre ou seule l'immunité adaptative, représentée ici par les lymphocytes T, l'IL12 ainsi que l'IFN $\gamma$ , est nécessaire à leur maintien à l'état de dormance. Suite à une pression de sélection constante de ces cellules génétiquement instables, il peut arriver que ces variants ne soient plus reconnus par l'immunité adaptative et deviennent insensibles aux mécanismes des effecteurs immunitaires ou induire un état immunosuppresseur au niveau du microenvironnement tumoral. Ces cellules tumorales vont alors entrer dans la phase d'échappement se caractérisant par une croissance tumorale non contrôlée, jusqu'à l'apparition clinique de la pathologie.

Figure adaptée de (Schreiber et al., 2011)



**Figure 4. Septième caractéristique du cancer : l'échappement à l'immuno-surveillance.**

Relation entre les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire de l'hôte.

Cette figure illustre le concept central selon lequel plusieurs étapes de la carcinogenèse sont le résultat de l'interaction entre les facteurs tumoraux (dus aux cellules tumorales) et le système immunitaire de l'hôte.

*Figure adaptée de (Zitvogel et al., 2006) et (Dunn et al., 2004b)*

## **b. L'immuno-édition remise en question ... la tumeur serait elle tolérée ?**

De nombreuses études ont tenté de remettre en question le concept d'immuno-édition. En effet, en 2005 *Willimsky* de l'équipe de *Thomas Blankenstein* et ses collègues ont développé un modèle murin de cancer sporadique basé sur une rare activation spontanée d'un oncogène dormant. Ils ont ainsi pu démontrer que les tumeurs plutôt que d'être engagées dans un processus d'immuno-sélection (ou immuno-édition), induisent une tolérance immunitaire qui n'est pas due à l'absence d'antigènes tumoraux, car les souris vaccinées sont capables de rejeter les cellules tumorales injectées avant la formation des tumeurs spontanées. (Willimsky and Blankenstein, 2005).

En 2013, la même équipe a publié une autre étude qui met en évidence une induction locale de tolérance antigénique spécifique dans un modèle de carcinomes hépatocellulaire viro-induits (Willimsky et al., 2013).

Récemment, *Ciampricotti et al* ont établi un modèle expérimental de souris RAG2<sup>-/-</sup>/ MMTV-NeuT. Ces souris, en plus d'être immuno-déficientes (RAG2<sup>-/-</sup>), développent des tumeurs mammaires sous l'induction transgénique du proto-oncogène HER2/neu (sous le contrôle du promoteur MMTV « Mouse Mammary Tumor Virus »). Dans les souris HER-2/neu positives, le développement de carcinomes mammaires spontanés ainsi que la formation de métastases pulmonaires se sont révélés indépendants du système immunitaire adaptatif. En revanche, une augmentation des cellules CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> MDSC, une population suppressive, a été rapportée par plusieurs groupes (Melani et al., 2003), (Ciampricotti et al., 2012), (Ciampricotti et al., 2011). Le même phénomène a été observé chez les souris transgéniques FVBN202, dans un modèle de carcinome mammaire neu-positif (Kmieciak et al., 2008), (Worschech et al., 2008), (Takeuchi et al., 2004).

Enfin, plusieurs études utilisant le modèle de souris TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate) qui développent un adénocarcinome de la prostate grâce à l'expression du transgène SV40 T au niveau de la prostate, ont mis en évidence une induction de tolérance à l'antigène tumoral le considérant comme du soi. (Degl'Innocenti et al., 2008).

En définitive, lorsqu'on s'intéresse aux études réalisées dans le domaine de l'immunité anti-tumorale, on constate que les conclusions tirées dépendent grandement des modèles utilisés. En effet, les modèles de tumeurs spontanées décrivent souvent une modulation du bras suppresseur du système immunitaire (réaction de tolérance) alors que les modèles de tumeurs induites tendent vers une activation du bras effecteur de l'immunité adaptative (réponse anti-tumorale).

## 5. La tolérance...

Il existe plusieurs mécanismes régissant la tolérance: (i) la tolérance centrale qui est acquise au cours de la différenciation lymphocytaire, au niveau du thymus (pour les lymphocytes T) ou de la moelle (pour les lymphocytes B) et qui débute pendant la vie embryonnaire, (ii) la tolérance périphérique, qui permet l'élimination des lymphocytes potentiellement auto-réactifs qui ne l'ont pas été au cours de la tolérance centrale (Pardoll, 2003).

Je ne rentrerai pas dans les détails des concepts concernant la tolérance immunologique, je me concentrerai sur la tolérance en lien avec l'immunité anti-tumorale.

### a. Une immunosurveillance par les lymphocytes T régulateurs ?

#### *La place des lymphocytes T régulateurs dans l'immunité anti-tumorale*

Un des rôles centraux du système immunitaire est de discriminer le « soi » du « non soi », avec l'objectif de prévenir l'auto-immunité. Étant donné l'origine et l'homogénéité antigénique des cellules tumorales, on peut raisonnablement penser que le système immunitaire considère ces cellules comme du soi, plutôt que des cellules étrangères (non soi) à éliminer. Dans cette perspective, ce phénomène de tolérance des cellules tumorales va avoir comme conséquence la non-réponse aux antigènes tumoraux, de la même manière que le système immunitaire ne détruit pas les antigènes du soi (tolérance périphérique).

#### *Les années 60-70... Des cellules immunosuppressives*

Les années 1960 ont été une phase révolutionnaire dans beaucoup de domaines y compris celui de l'immunologie. À partir des travaux de *Gowans et al.* les immunologistes ont commencé à apprécier l'importance des lymphocytes circulants comme médiateurs de l'immunité (Gowans, 1959), (Gowans et al., 1962). Les lymphocytes étaient alors séparés en deux groupes, les lymphocytes dérivant du thymus qui ne secrètent pas d'anticorps et les lymphocytes dérivant de la moelle osseuse qui eux secrètent des anticorps. *Les lymphocytes thymiques sont-ils impliqués dans un mécanisme de tolérance via des interactions cellulaires ?* C'est afin de répondre à cette question que *Gershon et Kondo* ont démontré, en 1970, que non seulement la réponse est affirmative mais aussi que cette tolérance –appelée de manière provocante «suppression infectieuse»- pouvait être transférée à des souris naïves. En effet, ils ont suscité de vives réactions et ont eu du mal à publier leur étude, finalement acceptée dans *Immunology* en 1970 et 1971 (Gershon and Kondo, 1970), (Gershon and Kondo, 1971).

Au cours de cette décennie, de nombreuses publications ont fait état de l'existence d'une population cellulaire suppressive, empêchant l'action des lymphocytes cytotoxiques de détruire les cellules tumorales, chez la souris (Treves et al., 1974).

Dès 1975, *Fujimoto et al* ont démontré que le fait de traiter des animaux inoculés par des tumeurs avec un sérum anti-thymocytes, ou bien de splénectomiser des animaux porteurs de tumeurs permettait une inhibition de la croissance tumorale voire un rejet de la tumeur. Forts de ces observations, ils conclurent que les animaux porteurs de tumeurs mettaient en place une réponse immunitaire via des cellules T immunosuppressives qui régulaient négativement la réponse immunitaire symétrique visant à détruire les cellules tumorales (Fujimoto et al., 1976), (Greene et al., 1977).

### *Les années 80... Une immuno-suppression tumorale par des cellules T*

En 1980, les observations de *Fujimoto* ont été confirmées par *Berendt* et *North* qui ont validé l'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale favoriserait la génération de lymphocytes T qu'ils avaient déjà appelés « suppresseurs ». En effet, en s'intéressant de plus près à ces cellules suppressives, ils ont pu montrer qu'en présence de cellules tumorales, les versants effecteur et suppresseur coexistaient. Ils ont alors divisé les cellules T en effectrices (Lyt1<sup>-</sup>2<sup>+</sup>) et suppressives (Lyt1<sup>+</sup>2<sup>-</sup>) (North and Bursucker, 1984), les cellules effectrices Lyt1<sup>-</sup>2<sup>+</sup> étant capables de déclencher un rejet de la tumeur une fois transférées dans des souris immuno-déficientes. Par la suite, ils ont limité les cellules suppressives au phénotype CD4<sup>+</sup>L3T4<sup>+</sup> et ont montré que la déplétion de ces cellules par anticorps anti-L3T4 a pour conséquence un rejet de la tumeur via les cellules effectrices Lyt1<sup>-</sup>2<sup>+</sup> et les cellules CD8<sup>+</sup> (DiGIACOMO and North, 1986).

Parallèlement, *Sakaguchi et al* s'intéressaient aussi aux cellules T suppressives. Ils ont mis en évidence dans un modèle d'auto-immunité induite chez des souris thymectomisées (à 3 jours) ou des souris NUDE, qu'une population cellulaire Lyt1<sup>+</sup> était capable de prévenir l'auto-immunité (Sakaguchi et al., 1982).

A la fin des années 1980, on pensait que CD4 et CD5 (L3T4<sup>+</sup> Lyt1<sup>+</sup>) étaient les marqueurs des cellules suppressives impliquées dans l'immunité tumorale et les maladies auto-immunes. Le manque de supports techniques et de marqueurs permettant de distinguer clairement les cellules effectrices des cellules suppressives a mis le sort de ces dernières en suspens.

### *Les années 90... la « découverte » des Tregs*

Les doutes sur l'existence des cellules T suppressives n'ont été levés seulement qu'en 1995 lorsque *Sakaguchi* a mis en évidence qu'une population cellulaire CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> baptisée « régulatrice » était responsable de l'induction d'une tolérance dominante aux tumeurs, il a

ainsi redécouvert les cellules régulatrices. En 1999, *Shimizu* et ses collègues ont démontré pour la première fois que la déplétion de ces cellules régulatrices (Tregs), précédée d'un challenge tumoral, pouvait prévenir le développement de la tumeur dans des souris BALB/c. Ceci démontre donc que des lymphocytes T conventionnels (Tconv) ont la capacité d'éradiquer les cellules tumorales. Il apparaît cependant que les Tregs sont toujours capables de dominer ces Tconv puisqu'en l'absence de manipulation, les cellules tumorales se développent quand même. L'autre indication que les Tregs jouent un rôle important dans les réponses immunes contre les cellules cancéreuses est venue de l'observation qu'un challenge tumoral est souvent rejeté chez les souris déplétées en Tregs (Onizuka et al., 1999). Cette observation a été confirmée par un grand nombre d'études utilisant différents modèles tumoraux dans plusieurs fonds génétiques.

### *Les années 2000... enfin un marqueur*

Chez l'homme, plusieurs études ont rapporté l'existence d'une corrélation négative entre leur abondance et la survie (Curiel et al., 2004) et pour plusieurs d'entre elles, une augmentation des Tregs chez les patients présentant des tumeurs (Zitvogel et al., 2008).

Cependant, une méta-analyse réalisée récemment a montré que dans 40 % des études publiées, les cellules Tregs sont associés à un bon pronostic clinique (Fridman et al., 2012), ce qui rejoint ce qui a été démontré par *Badoual et al* à savoir une corrélation positive entre le Tregs et le pronostic de patients atteints de cancer de la tête et du cou (Badoual et al., 2006).

*Bergot et al* ont démontré que, chez les souris BALB/c, la déplétion des Tregs permet d'éradiquer les cellules tumorales chez 80% et 100% des souris ayant reçu respectivement des tumeurs 4T1 et AB1. Cela dit, la déplétion des Tregs dans les souris C57BL/6 ne permet que de retarder la croissance tumorale (Bergot et al., 2010). Ces résultats suggèrent que l'immunogénécité des cellules tumorales jouent un rôle crucial dans le déclenchement d'une réponse immune efficace. Ces observations et les relations entre l'immunogénécité des tumeurs et la réponse immunitaire dirigée contre ces mêmes cellules seront discutées dans III.

### *Tregs périphériques ou Tregs thymiques ?*

Brièvement, on distingue deux grands types de Tregs : *les Tregs thymiques* (ou tTregs, anciennement « Tregs naturels » ou « nTregs ») issus du thymus fonctionnellement matures et suppresseurs et *les Tregs périphériques* (ou pTregs, anciennement « Tregs induits » ou « iTregs ») issus de la conversion périphérique de T conventionnels.

La littérature implique plusieurs mécanismes potentiels pour expliquer l'augmentation des Tregs provoquée par les cellules tumorales:

- i. Le recrutement préférentiel des tTregs (Yang et al., 2006), (Curiel et al., 2004)]

- ii. La conversion de novo des pTregs.
- iii. L'expansion clonale: prolifération des tTregs en périphérie due à une induction cytokinique et/ou antigénique.

### ***Vers une conversion de novo des pTregs***

Dès leur découverte au début des années 2000 chez la souris (Chen et al., 2003) et chez l'Homme (Zheng et al., 2002) les pTregs ont été à l'origine d'une recherche active dans le domaine l'immunologie anti-tumorale, ce qui a eu pour conséquence des avis divergents quant à leur rôle dans la tolérance induite par les cellules tumorales. Afin de déterminer le rôle des pTregs dans l'immunité anti-tumorale, **Zhou et al.** ont réalisé un transfert adoptif de cellules T conventionnelles CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> dans des souris injectées par différents types de tumeurs. Ainsi, ils ont pu révéler une induction de l'expression de CD25, ainsi qu'une augmentation des transcrits de Foxp3, le facteur de transcription caractéristique des Tregs, et par conséquent, une conversion des cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> injectées en pTregs (Zhou and Levitsky, 2007). Beaucoup d'études se sont intéressées au TGFβ, une cytokine pléiotropique jouant un rôle crucial dans l'immunité, le cancer et dans la conversion des cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> en pTregs (Zheng et al., 2002).

Cependant, ce résultat est discutable car les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> purifiées contiennent environ 2% de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> qui présentent des propriétés suppressives (Fontenot et al., 2005) et qui peuvent ré-exprimer le CD25 et proliférer après stimulation comme l'ont signalé **Zelenay et al** (Zelenay et al., 2005).

D'autres auteurs ont suggéré que les Tregs exprimant Helios étaient la population la plus représentée au sein du microenvironnement tumoral (Zabransky et al., 2012). Helios étant un marqueur des tTregs (Getnet et al., 2010), cet argument irait à l'encontre d'un potentiel rôle des pTregs dans le microenvironnement tumoral. Cela étant dit, Helios pourrait être up-régulé en périphérie dans les pTregs après activation par les cellules dendritiques (Verhagen and Wraith, 2010).

Ainsi, le rôle des pTregs au sein du microenvironnement tumoral demeure une question en suspens.

### ***Ou bien vers un recrutement des tTregs***

Dans une étude élégante, **Malchow et al.** ont remis en question l'implication des pTregs en analysant la réponse immunitaire des souris TRAMP (TRAnsgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate) qui développent un adénocarcinome de la prostate grâce à l'expression du transgène SV40 T au niveau de la prostate. Ils ont mis en évidence dans ce modèle, que la tumeur ne déclenche pas la conversion des T CD4<sup>+</sup> effecteurs en Tregs mais recrute des Tregs

préexistants, réactifs aux antigènes du soi exprimés sous le contrôle de Aire (facteur de transcription implique dans l'expression ectopique de protéines) et associés à l'organe à l'origine du cancer à savoir la prostate (Malchow et al., 2013).

La balance semble donc pencher en faveur d'un rôle des tTregs par rapport aux pTregs mais cela mérite d'autres confirmations et notamment chez l'homme.

D'autres mécanismes impliquant la molécule CCR4 exprimés par les Tregs ont été décrits comme jouant un rôle important dans le recrutement des ces cellules Tregs. En effet, chez la souris, *Pere et al.* ont mis en évidence qu'un antagoniste du CCR4 combiné à une vaccination induisent une réponse CD8<sup>+</sup> dirigés contre les antigènes du soi (Pere et al., 2011), (Ménétrier-Caux et al., 2009).

### *Le combat Tregs vs Tconv ... une histoire de statut et de rapidité*

#### *Les évènements précoces de la réponse anti-tumorale*

En 1975, *Bhatnagar* et ses collègues ont réalisé des mesures ex-vivo d'incorporation de thymidine par les splénocytes de souris BALB/c après une injection intra-péritonéale de fibrosarcomes chimiquement induits par le MCA. Ils ont pu détecter des réponses immunitaires cellulaires très précoces, à savoir à jour 2 voire 1 après l'injection de cellules tumorales. L'intensité et la rapidité de la réponse cellulaire est dépendante du nombre de cellules injectées et est toujours suivie d'une perte graduelle de la réactivité du système immunitaire vis à vis de la tumeur. Cette perte progressive de la reconnaissance immunitaire des cellules tumorales corrélait parfaitement avec la croissance tumorale (Bhatnagar et al., 1975). *Fujimoto et al.* ont démontré dans un article publié en 1976 que ce qu'ils avaient auparavant appelé cellules immunosuppressives « IS » était généré dans les souris porteuses de tumeurs dans les 24h après l'inoculation des cellules tumorales (sarcomes induits par le MCA) et que ces cellules IS persistaient tout au long de la croissance tumorale (Fujimoto et al., 1976).

Plus récemment, *Darasse-Jèze et al.* se sont intéressés à la cinétique de la réponse immunitaire précoce dans différents modèles murins classiques de tumeurs (B16 mélanome, 4T1 carcinome, et AB1 mésothélium), ainsi que dans un modèle de tumeur mammaire «spontanée», inductible par la doxycycline (Darrasse-Jèze et al., 2009).

Ils ont mis en évidence que contrairement aux cellules T conv, les Tregs sont activés et se divisent très précocement (dès le 2eme jour suivant l'émergence de la tumeur), ce qui laisse penser qu'en présence de cellules tumorales les Tregs prennent le dessus sur les Tconv naïfs. En effet, lorsque des Tconvs naïfs spécifiques d'un antigène tumoral sont injectés le même jour que les cellules tumorales (Jour<sub>0</sub>), ceux-ci n'ont aucun effet sur le développement de la

tumeur. Au contraire, lorsque ces Tconv proviennent d'une souris préalablement immunisées, ils sont activés avec la même cinétique que les Tregs qui ne peuvent plus les contrôler, permettant ainsi le rejet de la tumeur.

### *Les amTregs*

*Fisson et al.* ont mis en évidence une sous population de lymphocytes T régulateurs « activés mémoires » (amTregs) spécifiques du soi caractérisés par l'expression de la molécule CD44 à un niveau élevé (Fisson et al., 2003). Ces cellules ont la caractéristique d'être constamment activées à l'état basal. Plusieurs données indiquent que les amTregs sont les cellules impliquées dans la suppression permanente des réponses immunes contre les antigènes du soi (Karim et al., 2005). Ces cellules amTregs ont été par la suite caractérisées par plusieurs équipes par l'expression de divers marqueurs tels que ICOS, CCR4, GARP (Pere et al., 2011), (Wang et al., 2009).

Par la suite, *Darasse-Jèze, Bergot et al.* ont montré que l'apparition des cellules tumorales est immédiatement perçue par ces amTregs spécifiques d'antigènes du soi. Ces amTregs sont ainsi activés précocement et très efficacement par les cellules tumorales. La réponse des amTregs induite contre les antigènes du soi de la tumeur est donc beaucoup plus efficace que celle des Tconv qu'elle domine puisqu'il s'agit d'une réponse secondaire, par essence plus rapide et efficace que la réponse primaire des Tconv naïfs dirigée contre les néo-antigènes tumoraux. Ils ont déduit que la balance entre les réponses des Tconv et des Tregs ne dépend pas de leur nombre respectif mais plutôt de leur statut de cellule « mémoire ».

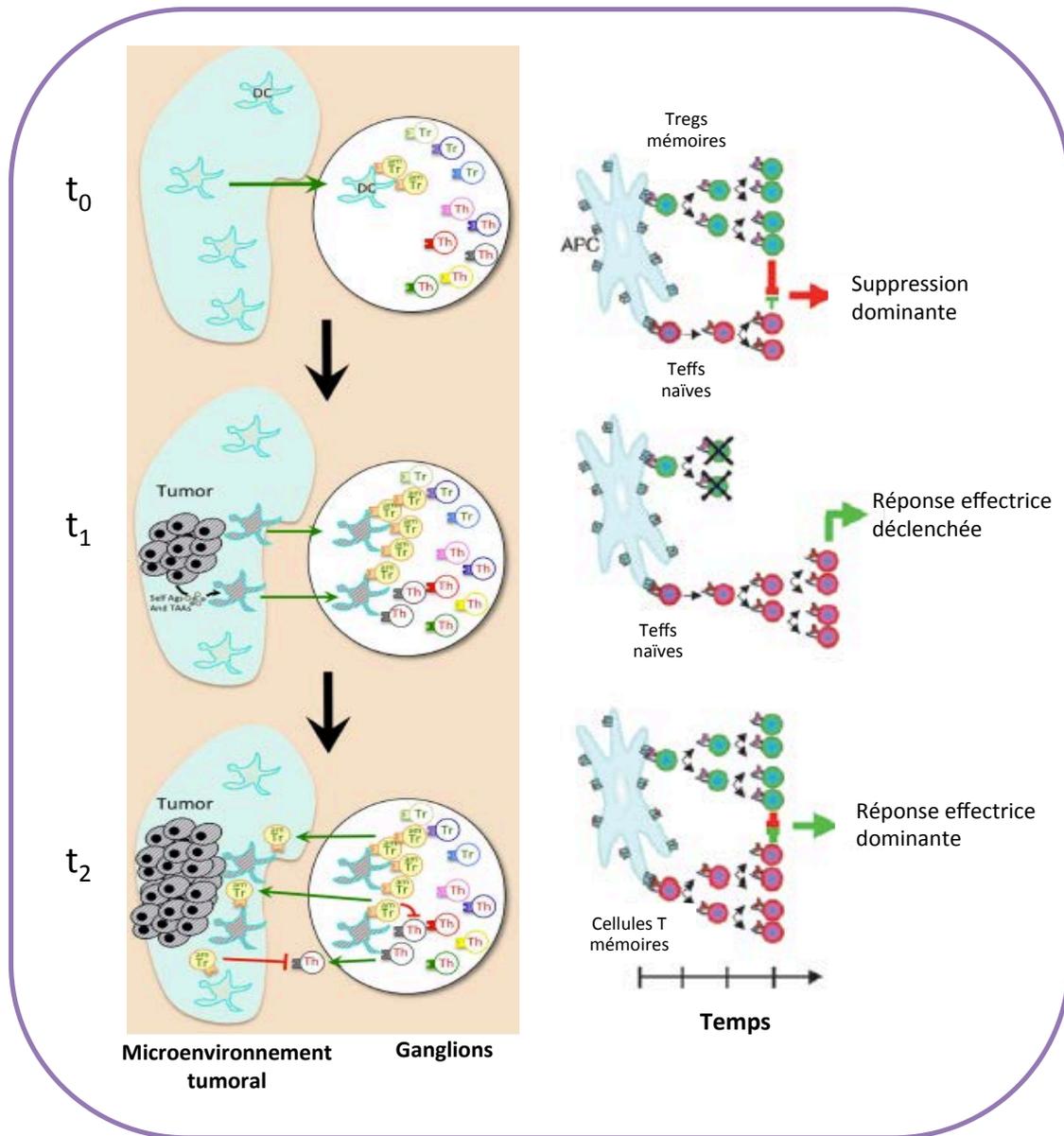
De plus, lorsque des Tconv mémoires sont injectés quelques jours après les cellules tumorales, ils perdent totalement leur capacité à éradiquer les tumeurs (Darrasse-Jèze et al., 2009), (Figure 5).

Les conclusions de l'étude ont été que :

- (i) Les antigènes tumoraux capables de stimuler l'expansion des Tregs sont des antigènes du soi.
- (ii) En l'absence de manipulations, une immunosurveillance médiée par les amTregs spécifiques du soi protège le tissu tumoral comme elle protégerait n'importe quel tissu normal.
- (iii) Dans les tous premiers jours du développement tumoral, un environnement tolérant dominant est rapidement mis en place au niveau de la tumeur.

Ces observations viennent confirmer des études précédentes qui avaient démontré que des Tregs antigènes spécifiques inhibent les réponses anti-tumorales (Nishikawa et al., 2003; Vence et al., 2007). Ceci n'exclut néanmoins pas la possibilité que des Tregs spécifiques de

néo-antigènes tumoraux peuvent aussi participer à l'induction de tolérance aux cellules tumorales (Wang et al., 2005). Cela va dans le même sens de ce qui a été souligné précédemment par l'étude menée par *Malchow et al* qui démontre que des tTregs préexistants et réactifs aux self-antigènes associés à l'organe à l'origine du cancer sont recrutés au niveau du site tumoral (Malchow et al., 2013).



**Figure 5. Les évènements précoces durant l'émergence de la tumeur conduisent à une tolérance des cellules tumorales.**

(a) Les cellules Tregs activées mémoires (amTregs or amTr, lymphocytes beige) sont les premières à être stimulées en présence de cellules tumorales (cellules grises arrondies) via la reconnaissance des antigènes du soi présentés par les cellules dendritiques (DCs, cellules grises étoilées) en provenance du site tumoral ( $t_1$ ). Les amTregs vont proliférer plus rapidement que les Teffs spécifiques d'antigènes tumoraux ou TAA, (lymphocytes gris) qui sont naïfs (ou ont déjà été supprimés à l'état basal). Les amTregs vont inhiber leur activation, prolifération, migration et leur fonction mais aussi la présentation antigénique et la co-stimulation ( $t_2$ ). (b) Modèle simplifié de la décision d'immunotolérance versus d'immuno-rejection basée sur le statut mémoire et sur la cinétique d'activation.

*Figure adaptée de Darrasse-Jèze et al., 2009 et Darrasse-Jèze and Podsypanina, 2013*

### III. Tolérance Fœto-maternelle vs Cancer... même combat ?

#### 1. Le fœtus ... Une greffe allo-génique tolérée !

##### a. Les années 1950-1960... la tolérance

C'est en 1953, au moment où il obtenait le prix Nobel pour la découverte du phénomène de «tolérance immunologique», que Sir **Peter Medawar** pointa le fait que le concept de survie de mammifères génétiquement disparates (allo-géniques) était en contradiction flagrante avec les lois de la transplantation tissulaire. **Medawar** avait alors considéré que trois mécanismes pourraient expliquer ce paradoxe immunologique : (i) La séparation anatomique entre la mère et le fœtus, (ii) l'immaturation immunogène du fœtus, et (iii) ce qu'il a appelé l'inertie immunologique (tolérance) de la mère.

Les premières hypothèses émises afin d'essayer comprendre ce paradoxe ont été d'abord négatives : absence d'antigènes exprimés par le placenta du fœtus, absence ou diminution des réactions immunitaires de la mère. Mais à la suite des travaux réalisés à partir du milieu des années soixante et surtout des années soixante-dix, il a fallu admettre que « *le bébé doit d'abord se faire reconnaître comme étranger pour que sa venue au monde se déroule le mieux possible* ».

##### b. Les années 70-80... entre rejet et facilitation

La notion de facilitation immunologique a été démontrée depuis longtemps par **Casey (1932–34)** et par **Kaliss (1951–55)** car une injection de tissus tumoraux lyophilisés, souvent loin d'entraîner une immunisation du receveur, peut augmenter sa sensibilité à l'injection de cellules vivantes de la même tumeur. Par la suite, ce concept a été décrit par **Voisin et al.** dans le cadre de greffes allogéniques de tumeurs puis dans les études de non rejet maternel du fœtus (Voisin and Chaouat, 1974). Plusieurs études ont été effectuées afin de résoudre l'énigme du non rejet de l'allogreffe.

#### ***Une facilitation humorale : des anticorps masquant les antigènes paternels ?***

La production d'anticorps de natures diverses « facilitant » ou « bloquant », qui masqueraient les antigènes paternels, a été proposée comme explication possible à ce paradoxe. En effet, de tels anticorps peuvent être élués de placentas implantés dans l'utérus d'une souris « productrice » (Voisin and Chaouat, 1974). Cependant, la majorité des souris est « non productrice » et donc dans l'impossibilité de produire de tels anticorps bloquants. Par ailleurs, chez les rongeurs comme chez l'homme, la grossesse est pleinement compatible avec une agammaglobulinémie, naturelle ou provoquée. Par conséquent, la facilitation humorale ne

peut pas être retenue comme mécanisme clé de la survie du fœtus.

### ***Une facilitation au travers de facteurs inhibiteurs du rejet ?***

D'autres éléments sériques non spécifiques produits au cours de la grossesse normale contribuent au maintien de la greffe fœto-placentaire par leur effet inhibiteur de certaines fonctions de rejet. Parmi ces nombreux facteurs se trouvent par exemple la progestérone, hCG. (Fizet and Bousquet, 1983)

### ***Une facilitation cellulaire : des cellules suppressives protégeant le fœtus ?***

**Chaouat et Voisin** ont démontré que l'immunité cellulaire est également déviée vers une immunité de tolérance. Leurs études chez la souris, au cours de la gestation, ont mis évidence la présence de cellules suppressives dont l'induction dépend d'un facteur placentaire et qui a pour conséquence une réaction de facilitation envers les antigènes fœtaux d'origine paternelle (Chaouat and Voisin, 1979). Ils ont conclu leurs études en émettant l'hypothèse qu'au cours de la gestation une bataille se met en place entre le rejet de fœtus (via les cellules immunitaire maternelles) et la facilitation (via les cellules suppressives) et que cette bataille est remportée par les cellules suppressives. Chez la femme, de telles cellules ont pu être mises en évidence par **Engelman et al** (Engleman et al., 1978).

### **c. Les années 90...**

**Munn et al** ont démontré l'importance de la molécule immunosuppressive IDO (exprimée par les trophoblastes et les macrophages) dans la prévention du rejet de d'allogreffes fœtaux. IDO est une enzyme catabolisant le tryptophane (un acide aminé essentiel). Afin de se protéger du rejet dû au système immunitaire de la mère, le fœtus cataboliserait le tryptophane (via IDO) ce qui aurait pour conséquence une suppression des cellules T maternelles. (Munn et al., 1998).

**Jiang et al** ont rapporté que le nombre de cellules T reconnaissant les antigènes du fœtus diminuent de façon antigène spécifique durant la grossesse, ce qui va dans le sens d'une délétion clonale périphérique au niveau du système immunitaire de la mère (Jiang and Vacchio, 1998).

**Clark et al** ont mis en évidence l'implication de plusieurs cytokines tels que le dans le succès ou l'échec de la grossesse. En effet, ils ont montré que l'injection d'anti-IL2-R ou même un anti-TGF $\beta$  avait pour conséquence une augmentation significative du taux de résorption du fœtus. (Clark et al., 1991)

#### **d. Les années 2000... les Tregs s'emmêlent**

En plus de contrôler les réponses auto-immunes, les Tregs jouent un rôle majeur dans la tolérance aux allo-antigènes.

L'importance du rôle des Tregs a été montrée chez la souris gestante où l'on observe que l'élimination des Tregs s'accompagne d'un taux anormalement élevé d'avortement de fœtus semi-allogéniques (Darrasse-Jèze et al., 2006). En effet, *Aluvihare et al* ont transféré dans des souris nu/nu des lymphocytes avec ou sans déplétion préalable des cellules CD25<sup>+</sup> (Tregs). Toutes les souris femelles réceptrices BALB/c nu/nu ont été accouplées avec des souris C57BL/6 males un jour après le transfert adoptif des lymphocytes. Après injection de lymphocytes totaux (non déplétés en CD25<sup>+</sup>), les fœtus sont viables dans les grossesses allogéniques alors que quand des lymphocytes déplétés en Tregs (CD25<sup>-</sup>) ont été injectés, tous les fœtus sont rejetés dans les grossesses allogéniques mais sont viables dans les grossesses syngéniques. Ces observations indiquent que les Tregs jouent un rôle essentiel dans la tolérance maternelle au fœtus (Aluvihare et al., 2004).

De plus, chez l'homme et la souris, les Tregs sont retrouvés en nombre croissant dans la membrane utérine (déciduale), pendant les deux premiers trimestres de grossesses (Heikkinen et al., 2004) et leur nombre dans le sang décroît rapidement après l'accouchement (Darrasse-Jèze et al., 2006). Il est intéressant de noter qu'on retrouve un faible nombre de Tregs dans les tissus fœtaux avortés de façon spontanée, en comparaison avec le nombre retrouvé dans les tissus avortés de façon provoquée (Sasaki et al., 2004).

Pour autant, il existe d'autres mécanismes de tolérance fœto-maternelle que les Tregs puisque leur déplétion ne s'accompagne pas de stérilité. La tolérance s'établit aussi (Tafari et al., 1995) grâce à une variété de défenses non spécifiques présentes à la surface du trophoblaste (comme Fas-L, HLA-G, etc...) (Caucheteux et al., 2003)

#### **2. Fœtus toléré, cellules tumorales protégées ... une histoire d'(allo-)antigènes**

L'énigme immunologique soulevée par *Medawar* demeure tout à fait transposable aux cellules tumorales étant donné que ces dernières sont un mélange d'antigènes du soi et d'antigènes tumoraux (étrangers) potentiellement déclencheurs d'une réponse immunitaire de l'hôte. Or, malgré la présence de ces antigènes, le système immunitaire reste incapable d'éradiquer ces cellules. Il existe plusieurs similarités entre le micro-environnement tumoral et l'interface fœto-maternelle comme le résume la Figure 6. La déplétion des Tregs dans le contexte tumoral ou dans le cadre de la grossesse conduit à un rejet de la tumeur ou du fœtus. De plus, l'utilisation d'anticorps déplaçant les molécules immunosuppressives telles que le

TGF $\beta$  conduit à un fort taux de résorption de fœtus (Clark et al., 1991) et à un rejet de la tumeurs si associés à un anti-CTLA4 (Quezada et al., 2006).

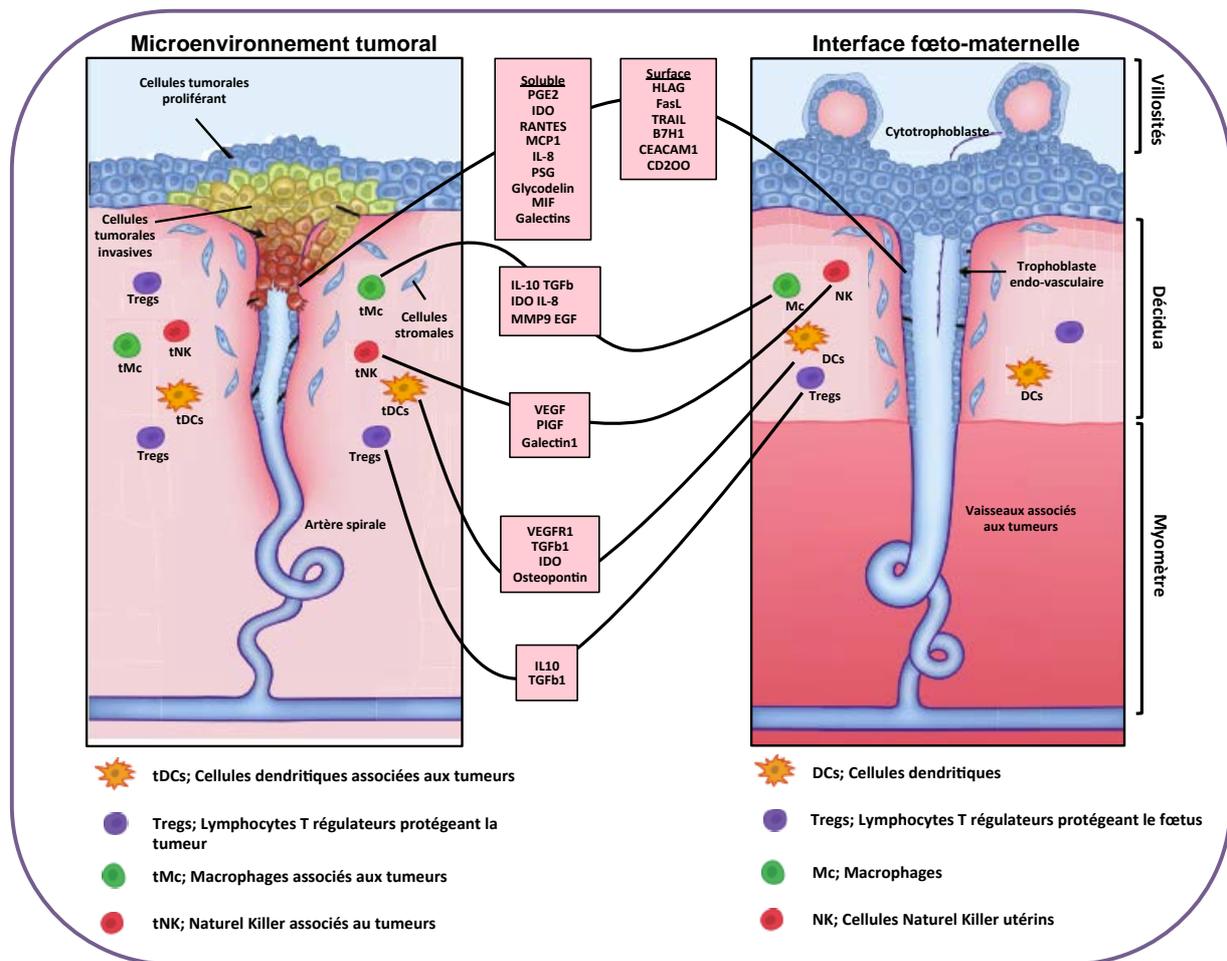
*Chen et al.* ont mis en évidence des similarités entre les réponses régulatrices précoces dues à l'implantation des tumeurs et celles dues à mise en place du fœtus. Ils ont démontré que les Tregs sont recrutés rapidement au niveau des ganglions drainant l'utérus et sont activés dès les premiers jours suivant l'implantation tumorale. Ces Tregs expriment les marqueurs des amTregs et sont spécifiques des antigènes du soi comme démontré dans l'émergence tumorale. Les amTregs protégeraient en quelque sorte l'embryon comme c'est le cas pour les tumeurs ce qui expliquerait, en partie, la croissance « non contrôlée » des tumeurs et des cellules embryonnaires.

#### **IV. Problématique & hypothèse de travail**

Suite aux résultats obtenus précédemment au laboratoire, à savoir la mise en évidence d'une implication des cellules T régulatrices (Tregs) dans l'instauration d'un environnement tolérogène permettant la protection d'une part des cellules cancéreuses (Darrasse-Jèze et al., 2009) et d'autre part du fœtus (Chen et al., 2013). L'objectif de mon travail a été dans un premier temps d'étudier et de comprendre les évènements précoces ayant lieu au sein du microenvironnement tumoral et, dans un second temps, d'étudier l'interface fœto-maternelle pour finalement comparer ces deux systèmes complexes.

L'étude du microenvironnement tumoral a été établi dans deux modèles murins (i) les souris BALB/c injectées avec des cellules AB1-HA (des tumeurs fortement immunogènes), (ii) les souris C57Bl/6 injectées avec des cellules B16 (des tumeurs faiblement immunogènes). La tolérance fœto-maternelle a quant à elle été étudiée dans un contexte allo-génique.

Afin d'étudier ces deux environnements, nous avons opté pour une approche d'Immunologie des Systèmes utilisant l'analyse du transcriptome. En effet, j'ai développé une stratégie d'analyse originale qui repose sur une approche systémique englobant à la fois des analyses supervisées (basées sur des hypothèses) et d'autres plus complexes non supervisées (sans a priori).



**Figure 6. Similarités entre l'interface fœto-maternelle et le microenvironnement tumoral.**

Afin de gérer l'allogreffe (fœtus, avec des antigènes maternels et paternels) ou les cellules tumorales (un mélange entre des antigènes du soi et du non soi), le système immunitaire mobilise globalement les mêmes types cellulaires (cellules dendritiques, NK, macrophages, lymphocytes T (T régulateurs et T conventionnels)). Dans les deux cas, pour survivre les cellules font appel à des facteurs de croissance (EGF, PIGF, VEGF), des cytokines (RANTES), une bonne vascularisation et des facteurs permettant l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte (IL-10, TGFβ,IDO, HLAG). *HLA = human leukocyte antigen, IL = interleukine.*

*Figure adaptée de (Holtan et al., 2009)*

## Chapitre II. : L'IMMUNOLOGIE DES SYSTEMES POUR L'ETUDE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

En 1749, le penseur de la nature *Buffon* disait dans Histoire Naturelle : «...l'étude de la nature suppose dans l'esprit deux qualités qui paraissent opposées : les grandes vues qui embrassent tout d'un coup d'œil et les petites attentions d'un instinct laborieux qui ne s'attachent qu'à un seul point».

### I. Le système immunitaire... un système complexe

#### 1. Un système...

Le terme « système » vient du grec *sustêma* qui signifie ensemble. Un système est un ensemble d'entités interagissant ou interdépendantes, abstraites ou concrètes, dont l'union forme un tout. Ainsi, un facteur de transcription régulant sa propre expression constitue un système, de la même façon que l'ensemble des molécules d'une cellule, l'ensemble des cellules d'un organisme, ou encore l'ensemble des individus d'une population. Différents systèmes peuvent être étudiés à partir des mêmes entités si l'on considère un type d'interaction plutôt qu'un autre.

#### 2. ...Complexe

L'étymologie de ce terme vient du latin *complexus* qui signifie « ce qui est tissé ensemble ». Comme le souligne si justement le philosophe français de la complexité Edgar Morin, aborder la complexité via le système, c'est bel et bien tisser des liens entre les éléments qui composent le système. Il faudrait donc développer une réflexion, des stratégies et des outils.

L'immunologiste cancérologue *George Klein* introduisait, il y a quelques années, un séminaire sur les voies de transmission de signaux cellulaires qui pouvaient se trouver perturbées dans le cancer en avertissant que «désormais, les biologistes doivent non seulement vivre avec la complexité mais l'aimer (*not only live with complexity but love complexity*) ».

En effet, la clé pour comprendre comment fonctionne le système immunitaire est donc de s'intéresser à la globalité des réactions mises en œuvre par ce système complexe et certainement pas aux éléments qui le composent individuellement (Germain et al., 2011).

Une complète compréhension du système immunitaire requiert une intégration de la façon dont les entités génétiques et épigénétiques collaborent ensemble, afin de produire une pléiade de comportements physiologiques et pathologiques caractéristiques de ce système. Le « réseau immunitaire » comprend toutes les connections (et les associations qui les régulent)

entre les cellules ainsi que la somme des interactions entre les produits des gènes dans la cellule. Avec plus de 30 000 gènes codants des protéines dans le génome mammifère auxquels s'ajoutent les microARNs et les couches encore méconnues du contrôle génétique, relier les points ce réseau immunitaire se révèle être une tâche herculéenne (Benoist et al., 2006).

## **II. Comment aborder ce système complexe ?**

Les réponses immunitaires sont des symphonies d'interactions moléculaires et cellulaires, où chaque élément remplit sa fonction afin de produire un effet que l'on perçoit en tant que réponse de défense de l'hôte, et qui une fois perturbées conduisent à des états pathologiques (immunopathologies ou immunodéficiences). Si l'on écoute séparément les notes de cette symphonie, on réalise rapidement qu'il nous est difficile voire impossible d'apprécier l'orchestre jouant à l'unisson.

### **1. La note ou le violon... l'approche réductionniste**

#### **a. Qu'est-ce que le réductionnisme ?**

Au cours du 19<sup>ème</sup> siècle et au début du 20<sup>ème</sup>, la biologie consistait en l'étude du fonctionnement et l'organisation des organismes vivants et de leurs composants, autrement dit la physiologie. Cependant, avec les formidables avancées technologiques à la fin des années 1970 et spécialement l'avènement de la biologie moléculaire, la biologie a pris un tournant « réductionniste » en se focalisant sur les cellules et molécules individuellement et l'immunologie n'a pas échappé à cette tendance.

Cette approche fut baptisée « approche réductionniste » car elle consiste, pour son étude, à décomposer un objet en éléments que l'on isole puis que l'on interroge individuellement. On les classe ensuite par catégories et descend ainsi d'étages en étages à la manière d'un jeu de poupées russes, jusqu'à trouver l'élément de base par lequel le système vit. Autrement dit, on cherche à comprendre la vie à partir de la caractérisation des macromolécules qui la constituent.

#### **b. L'approche réductionniste ne suffit plus**

Les connaissances acquises grâce à l'expérimentation réductionniste ont été essentielles et très importantes pour l'identification des composants du système immunitaire ainsi que pour la compréhension de la contribution des cellules et molécules identifiées dans le fonctionnement global de ce système complexe. Toutefois, elles se sont révélées insuffisantes pour rendre compte de la manière dont ces différents éléments s'intègrent les uns aux autres afin de

donner lieu aux réactions complexes caractérisant le système immunitaire (Germain et al., 2011).

Les questions que l'on peut se poser sont : *comment de petits changements qualitatifs au niveau de certains composants d'un système peuvent affecter le système dans sa globalité ?*

*Et comment expliquer que le fait d'invalider chez une souris, un gène impliqué dans de nombreuses fonctions vitales puisse avoir relativement peu de conséquences physiologiques ?*

Ces questions posent la limite de l'approche réductionniste et mettent en exergue que le système classique « un gène - une protéine - une fonction » est l'exception plutôt que la règle.

**Christophe Benoist** dans sa « plaidoirie pour l'immunologie des systèmes (Benoist et al., 2006) » a même osé comparer l'expérimentateur « réductionniste » à un des six hommes d'Hindoustan d'un proverbe indien narrant que, très enclins à parfaire leurs connaissances, ces hommes (bien qu'aveugles) allèrent voir un éléphant afin que chacun, en l'observant à sa manière, puisse satisfaire sa curiosité. Par la suite, ces hommes d'Hindoustan discutèrent longuement, chacun faisant valoir son opinion avec force et fermeté. Même si chacun avait partiellement raison, tous étaient dans l'erreur.

## 2. Ou plutôt la symphonie... l'approche systémique

### a. Biologie systémique... Des concepts historiques

La biologie des systèmes a vu le jour dans les années 1950, même si **Ludwig von Bertalanffy** l'un des précurseurs de la théorie des systèmes, avait lancé à travers l'expression de « théorie générale des systèmes » en 1938 l'idée d'une science qui devrait étudier les ensembles constitués d'un certain nombre d'éléments en interaction entre eux et avec leur environnement (von Bertalanffy, 1968). Cependant, cette théorie a été considérée comme étant trop abstraite pour être financée.

Dans les années 1950, **Norbert Wiener** alors professeur au MIT (Institut de Technologie de Massachussetts) et fondateur de la *biocybernétique* s'était intéressé à la logique des systèmes biologiques dès les années 1940, en publiant un ouvrage intitulé la *Cybernétique* (Wiener, 1948) (Wiener, 1956). En effet, il s'est focalisé d'une part sur la recherche d'un programme (cet aspect a été absorbé par la biologie moléculaire avec sa notion de programme génétique) et d'autre part sur la notion d'automate abstrait (plus ou moins intégré au sein de la biologie des systèmes).

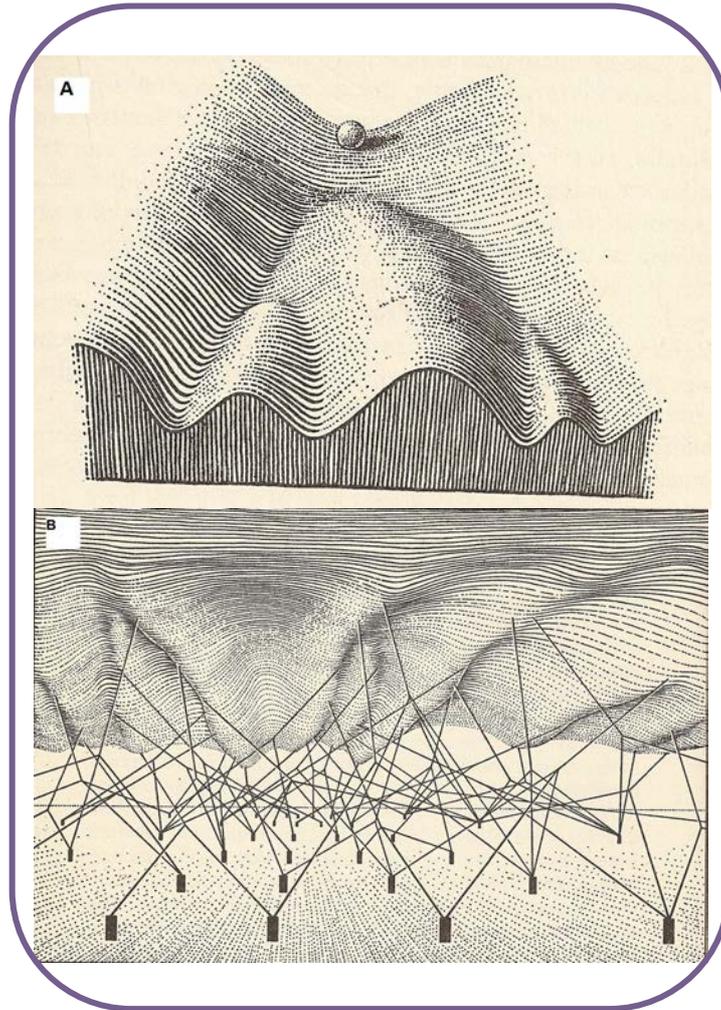
Parallèlement, **Canrad. H Waddington** établit le concept de « paysage épigénétique » (Waddington, 1957) (Figure 7). Il imagine les cellules passer d'un état de différenciation à l'autre en suivant un trajet dicté par la forme d'un paysage constitué de monts et de vallées, paysage lui-même créé par les interactions entre gènes. Cette vision de la cellule comme

système évoluant d'état en état s'inspire des travaux de **M. Delbruck** (Delbrück, 1949), **F. Jacob** et **J. Monod** (Monod and Jacob, 1961). Ils introduisirent, après la seconde guerre mondiale, la notion de système en biochimie, comme un mécanisme susceptible d'expliquer le mystère de la différenciation en s'interrogeant sur *comment des cellules au génome identique peuvent-elles exprimer des formes et des propriétés aussi différentes que celles d'un lymphocyte et d'un myocarde ?* Ils proposèrent de voir les enzymes et leurs substrats comme les composants de circuits dynamiques, dont les exemples les plus simples sont les boucles de rétroaction négatives et positives. Dans le cas d'une boucle négative, l'augmentation du niveau d'un élément entraîne la diminution de son taux de production, ce qui a pour résultat une stabilisation de sa production et de son abondance, à la manière d'un thermostat. Une boucle positive en revanche a l'effet inverse, et donne lieu à deux scénarios opposés: si la boucle est enclenchée, l'élément encourage sa propre production, sinon il n'est pas produit. Ce type de circuits moléculaires et d'autres plus complexes ont depuis été très étudiés théoriquement, notamment par **R. Thomas** et ses collègues (Thomas and D'Ari, 1990). La réalité de ces systèmes a été démontrée expérimentalement dès la fin des années 1950 avec l'exemple de l'opéron lactose inductible de **A. Novick** et **M. Weiner** chez la bactérie *E. coli* (Novick and Weiner, 1957), puis à de multiples reprises au cours des cinquante dernières années, ce qui a permis à la biologie des systèmes de s'affirmer aujourd'hui comme une discipline à part entière.

#### **b. L'émergence d'une nouvelle discipline**

En même temps que se développaient les outils permettant de disséquer les cellules, gènes et protéines du système immunitaire, de nouvelles avancées technologiques ont permis une amélioration considérable du taux d'acquisition des données. Cela a eu pour conséquence la banalisation des micro-puces (Hoheisel, 2006), l'utilisation généralisée des méthodes de séquençage massif (Wold and Myers, 2008), l'avènement de la cytométrie en flux multiplexe (Perfetto et al., 2004) et la disponibilité de la protéomique à haut débit (Aebersold and Mann, 2003). Plutôt que d'explorer un seul élément, ces dernières technologies ont permis de sonder l'état des systèmes biologiques (l'expression du gène, l'identité de la protéine, ou la modification du substrat). Cela a conduit à un changement majeur dans la façon dont la recherche a été menée dans de nombreux laboratoires. En effet, plutôt que des expériences en cours de conception basées sur des hypothèses prédéfinies provenant de résultats préliminaires ou de la littérature, les méthodes à haut débit sont utilisées pour l'exploration « non biaisée » des propriétés d'un système pour générer alors de nouvelles hypothèses.

La capacité technique à produire à grande échelle de nouvelles données (jeux de données) a conduit à l'essor de ce qui a été considéré injustement au début des années 2000 comme étant une nouvelle discipline, «la biologie des systèmes» qui, dans sa forme la plus simple est l'ancienne physiologie refondue en forme moderne. Cette discipline, constitue une tentative de changement et de passage du très spécifique, du détail, de la molécule, du gène, à une analyse quantitative de ces éléments fonctionnant ensembles, ce qui permet de mettre en évidence de nouvelles propriétés. Elle pose les questions biologiques en mettant l'accent sur le «tout» plutôt que sur «les parties».



**Figure 7. Illustration de la notion de « paysage épigénétique».**

Au début des années 1940, il est proposé par le généticien *Conrad.H. Waddington* pour désigner une nouvelle science visant à étudier les mécanismes par lesquels le génotype engendre le phénotype. Ce concept constitue une image sur la régulation génétique du développement : les gènes dessinent un paysage que les cellules parcourent, lorsqu'elles se différencient, comme des rivières coulent le long d'une vallée. Dans cette vision, de nombreux gènes interviennent de manière distante dans le développement des organismes

*Figure adaptée à partir de (Carvunis et al., 2009)*

### c. LA BIOLOGIE des Systèmes vs. L'IMMUNOLOGIE des Systèmes

*L'immunologie des Systèmes est-elle distincte de la biologie systémique ? Où s'agit-il seulement de la biologie systémique appliquée à l'immunologie ?*

Selon le Professeur **Philippe KOURILSKY** du Collège de France, l'immunologie des systèmes s'en distingue par plusieurs considérations dont la plus évidente est que la biologie systémique s'intéresse principalement, à la biologie cellulaire, autrement dit, à des types cellulaires singuliers ou à des ensembles assez peu hétérogènes de cellules. Le pendant de cette « biologie cellulaire systémique » est la fraction de l'immunologie systémique qui, de même, s'intéresse à des types cellulaires identifiés participant à l'immunité innée ou à l'immunité adaptative.

Cependant, le système immunitaire possède plusieurs caractéristiques majeures, absentes ou moins essentielles dans d'autres systèmes, notamment : (i) la très grande diversité des molécules et des événements de reconnaissance ; elle résulte des gènes composites (qui codent pour les anticorps et les récepteurs des cellules T) et des protéines composites formées par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (les complexes CMH-peptides). (ii) Le taux très élevé de production, d'expansion et de mort de différents types de cellules immunes ; il accroît encore l'importance de la perspective dynamique. (iii) L'architecture et la topologie du système qui surveille et intervient dans la quasi-totalité du corps ; le système immunitaire étant largement liquide, contrairement au système nerveux, les questions relatives à la mobilité, la localisation et aux rencontres plus ou moins aléatoires entre acteurs sont capitales pour la fonction.

### d. L'approche systémique du point de vue de la littérature

*Une approche systémique pour l'étude de la littérature concernant le biologie des systèmes*

**Ideker et al** se sont intéressés au nombre de publications « biologie des systèmes » en réalisant une méta-analyse des publications sur PubMed entre les années 2000 à 2009. Ils se sont rendus compte que le nombre d'articles « biologie des systèmes » est passé d'une dizaine à plus de 2000 sur cette période (Figure 9). De plus, l'analyse des abstracts de ces publications pour en extraire les champs les plus populaires, en comparant les tendances avant 2007 et après 2007, a révélé que certains champs tels que « analyse d'expression génique » ou « biologie évolutive » se sont maintenus en tant que piliers de la biologie des systèmes alors que d'autres comme les « cellules souches » et la « biologie des réseaux » ont montré une progression. Quelques champs tels que « structure protéique » ou « génomique comparative » sont quant à eux sur le déclin (Chuang et al., 2010).

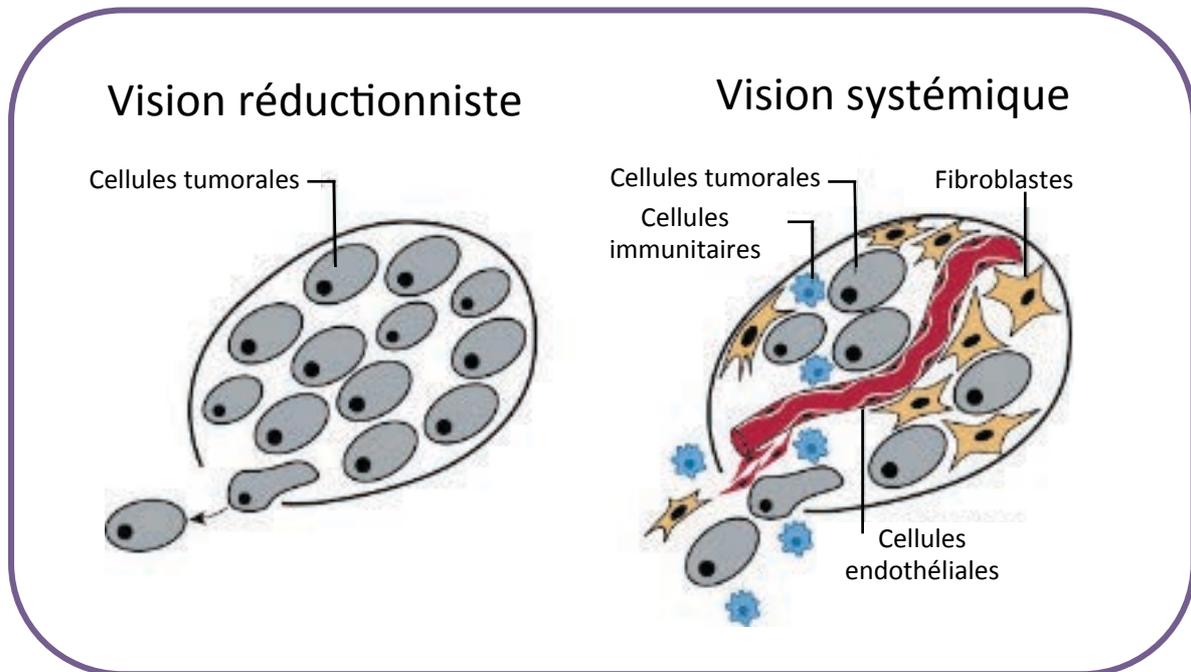
### *L'approche Immunologie des Systèmes ... Oui, mais comment?*

Une analyse sémantique d'articles publiés par des journaux spécialisés en Immunologie, pris au hasard, réalisée par **Benoist et al.** a mis en évidence de manière surprenante que 23 des 28 articles étudiés suivent le même schéma, baptisé  $x \langle y \rangle z$ . Selon le modèle  $x \langle y \rangle z$ , le facteur X interagit avec le facteur Y pour affecter le mécanisme Z, X et Y représentant un élément (en général un gène ou une protéine) et Z une fonction, comme la «présentation antigénique» ou encore «l'anaphylaxie». Ils décrivent également quelques variantes de ce modèle où X' phosphoryle Y' ou une souris déficiente en X perd la fonction Z'. Ce modèle «un facteur/ un évènement» ou « $x \langle y \rangle z$ » est donc le modèle qui prédomine dans la littérature. Cette situation semble paradoxale étant donné le long passé d'expérimentation non réductionniste de l'Immunologie. Avant l'avènement du clonage, des Cluster de Différentiation (CD) et des classifications de cytokines, la majeure partie de la recherche en Immunologie a été réalisée à l'échelle de l'organisme et a donc par conséquent été fortement intégrative. En effet, les immunologistes ont utilisé l'approche réductionniste bien avant que le terme Immunologie des systèmes ne devienne «à la mode» (Benoist et al., 2006).

### **3. L'orchestre au complet, ça sonne mieux... complémentarité**

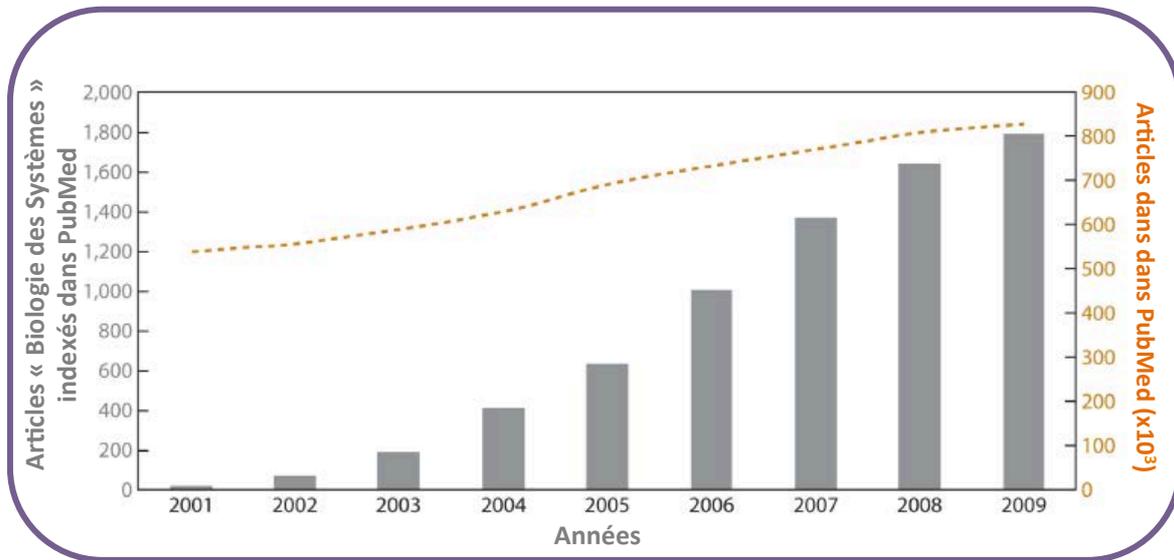
L'approche systémique a dû faire et fait encore face à de nombreuses critiques. **Ronald Germain** dans une revue consacrée à la biologie des systèmes (Benoist et al., 2006) cite une anecdote concernant une présentation d'Andrea Califano de l'université de Columbia, qui avait qualifié de «ridiculome» les graphes d'interactions entre molécules, car ces derniers - selon lui- étaient d'une grande complexité et incompréhensibles pour le commun des mortels. Ce type de critiques revient assez souvent dans le milieu scientifique et qu'elles soient ou non fondées, les biologistes du système doivent sûrement redoubler d'efforts afin de simplifier les représentations graphiques.

En définitive, l'approche réductionniste et l'approche systémique sont étroitement liées comme le montre la Figure 10. Il apparaît évident que les hypothèses et résultats générés via l'approche systémique doivent pouvoir être validés par les approches de mesure moléculaire classiques et par la littérature. Ceci a été mon leitmotiv tout au long de ma thèse.



**Figure 8. Vision réductionniste vs. Vision systémique du microenvironnement tumoral.**  
 Le champ de la recherche consacrée au cancer a été largement guidé par une concentration réductionniste sur les cellules cancéreuses et les gènes qui les réguleraient.

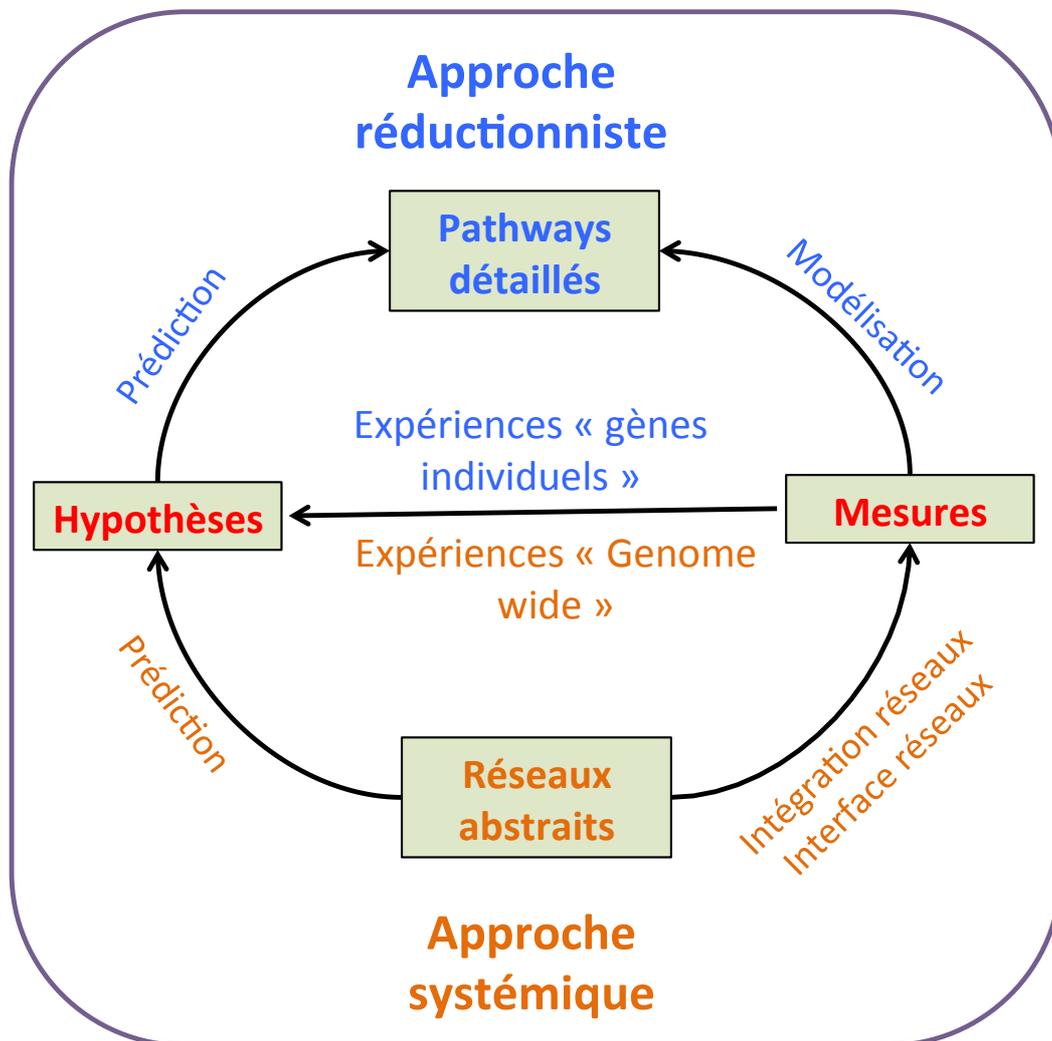
*Figure adaptée à partir de (Hanahan and Weinberg, 2000)*



**Figure 9. Méta-analyse des publications « Biologie des systèmes » durant la période 2001→2009.**

Les barres grises indiquent le nombre d'articles indexés dans PubMed et étiquetés "Biologie des Systèmes" par la Medical Subject Heading (MeSH) par an. A titre de référence, la ligne pointillée dorée montre le nombre d'articles totaux en milliers indexés dans PubMed par an.

*Figure adaptée à partir de (Chuang et al., 2010)*



**Figure 10.** Processus expérimentaux dans la Biologie classique (ou approche réductionniste) versus Biologie des systèmes.

Les deux approches sont fortement liées et complémentaires. En effet, l'approche « Biologie des systèmes » repose sur l'étude et l'analyse de réseaux abstraits via leur intégration et sur la prédiction. Elle permet ainsi la génération de nouvelles hypothèses qui peuvent être validées par des expériences et mesures « réductionnistes ».

*Figure adaptée à partir de (Chuang et al., 2010)*

### **III. L'immunologie des systèmes pour l'étude du microenvironnement tumoral**

Quand on s'intéresse au microenvironnement tumoral, on se rend très rapidement compte que c'est un système complexe. En effet, celui-ci est composé de cellules tumorales, de cellules immunitaires, des composants du stroma tels que les fibroblastes et une vascularisation complexe, tous ces éléments tendent à interagir entre eux.

Il apparaît évident que s'intéresser à une molécule ou une population cellulaire est une vision réductionniste. C'est donc naturellement que nous avons opté pour une approche systémique, afin d'apprécier les événements précoces régissant la réponse anti-tumorale.

## **II. FOUILLE DE DONNEES : METHODOLOGIE ET STRATEGIE D'ANALYSE**

### **Chapitre I. METHODOLOGIE**

La méthodologie appliquée afin d'obtenir des données prêtes à être exploitées est primordiale. Néanmoins, ceci n'étant pas le sujet principal du manuscrit, elle va être abordée sans entrer les détails techniques.

#### **I. L'approche transcriptomique**

L'une des caractéristiques partagées entre le microenvironnement tumoral et l'interface foëto-maternelle est leur extrême complexité. En effet, la tumeur d'une part et le foëtus d'autre part mettent en place des mécanismes divers et variés afin d'être tolérés par le système immunitaire de l'hôte. L'étude de ces systèmes complexes exige donc une prise en compte de ces différents mécanismes de régulation et voies de signalisations. Aussi, nous avons opté pour l'approche transcriptomique qui offre la possibilité d'apprécier l'expression simultanée de plusieurs milliers de gènes tant en condition normale que pathologique.

##### **1. Une méthode... plusieurs techniques**

Il existe plusieurs techniques d'analyse globale du transcriptome permettant d'appréhender la totalité des ARN messagers d'un tissu ou d'une population cellulaire. La première approche proposée fut le Northern blot. Elles permettent d'identifier et de localiser une séquence nucléotidique (l'ARN) aussi bien dans un génome entier, que dans un mélange complexe d'ADN (Southern, 1975). Ces techniques se limitent à analyser un petit nombre de gènes et ne permettent pas d'apprécier la complexité au niveau cellulaire. Aussi, d'autres techniques plus globales permettant l'analyse simultanée de l'expression de milliers de gènes ont vu le jour, parmi lesquelles la technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) qui consiste à réaliser un inventaire des transcrits par séquençage en série de courts fragments d'ADNc (9 à 14 paires de bases) (Velculescu et al., 1995). La technique SAGE permet une quantification absolue des ARNm, cependant, elle s'est révélée très peu reproductible.

Par la suite, l'apparition des puces à ADN a offert plus de perspectives d'applications (Lockhart et al., 1996 ; Lockhart and Winzeler, 2000 ; Schena et al., 1995). Les puces à ADN permettent non seulement l'étude du niveau d'expression de milliers de gènes d'un type cellulaire dans un contexte donné (sain ou pathologique), mais aussi d'étudier la séquence des gènes, les mutations et le polymorphisme.

Les puces à ADN constituent donc l'outil idéal pour identifier simultanément les constituants d'un mélange complexe d'ARN tels que ceux pouvant être trouvés dans les cellules du microenvironnement tumoral ou de l'interface foeto-maternelle.

## **2. Les puces à ADN**

### **a. Principe de la technologie**

Les techniques d'étude du transcriptome sont très largement utilisées et ont connu depuis une dizaine d'années un essor exceptionnel. Ces techniques, bien que très variées, sont basées sur un seul et même principe: l'identification dans une population d'ARN messenger donnée, d'un transcrit ou d'un ensemble de transcrits dont le niveau d'abondance varie par rapport à une autre population. Parmi divers technologies disponible sur le marché et développés par divers compagnies (Agilent, Afflmetrix...). Le site de la Pitié-Salpêtrière ayant acquis une plateforme de génotypage à haut débit "Illumina" depuis 2007, nous avons choisi d'utiliser les micro-puces Illumina BeadArray™, plus précisément les MouseWG-6 v2.0.

### **b. Les micro-puces Illumina**

Illumina est une entreprise américaine basée à San Diego qui a mis au point des puces à ADN basées sur la technologie « BeadArray » inventée par le Dr. David Walt, professeur de chimie à l'université de Tufts (Boston, USA) en 1998.

Brièvement, comme décrit sur la Figure 11, cette technique utilise des billes qui peuvent servir de support pour des milliers de sondes spécifiques de 50 bases. Les ARN extraits sont d'abord rétro-transcrit en ADN complémentaires (ADNc), puis une étape de transcription *in vitro* permet l'obtention d'ARNc. La synthèse d'ADNc et la transcription *in vitro* sont suivies de l'hybridation avec les billes. Les micro-puces « MouseWG-6 d'Illumina » contiennent plus de 46 000 sondes provenant de la banque de données NCBI. Les images des puces sont ensuite révélées en utilisant le lecteur d'Illumina.

## **3. L'approche transcriptome... ou comment étudier plus de 30 000 gènes simultanément**

Dans le cas d'une analyse différentielle, l'approche transcriptomique permet de comparer l'expression des gènes dans différentes conditions.

L'hypothèse sous-jacente de l'analyse des données de transcriptome est que l'intensité mesurée pour chaque gène représente son niveau d'expression relatif. Ces techniques expérimentales ne permettent pas de quantifier de manière absolue le nombre d'ARNm par cellule. En revanche, elles permettent de comparer de manière quantitative le niveau

d'expression des gènes dans deux conditions distinctes par exemple. On appelle « profil d'expression d'un gène », l'ensemble des mesures d'expression de ce gène au travers des différents échantillons. Les profils de ces gènes sont ensuite comparés entre des conditions expérimentales pour identifier des classes de comportements. Pour cela, il faut au préalable pré-traiter les données brutes c'est à dire les filtrer, vérifier leurs qualités et normaliser les niveaux d'expression, pour pouvoir les comparer de manière pertinente.

## **II. Traitement des données brutes**

Les données, dites brutes, importées puis extraites grâce un logiciel dédié *Illumina BeadStudio*®. Elles correspondent au signal moyen d'environ 30 à 60 billes portant des sondes identiques. Ces données comportent les informations sur l'intensité du signal des sondes spécifiques de gènes, des sondes de contrôle qualité, ainsi qu'une indication de la qualité de détection du signal pour chaque sonde de la puce.

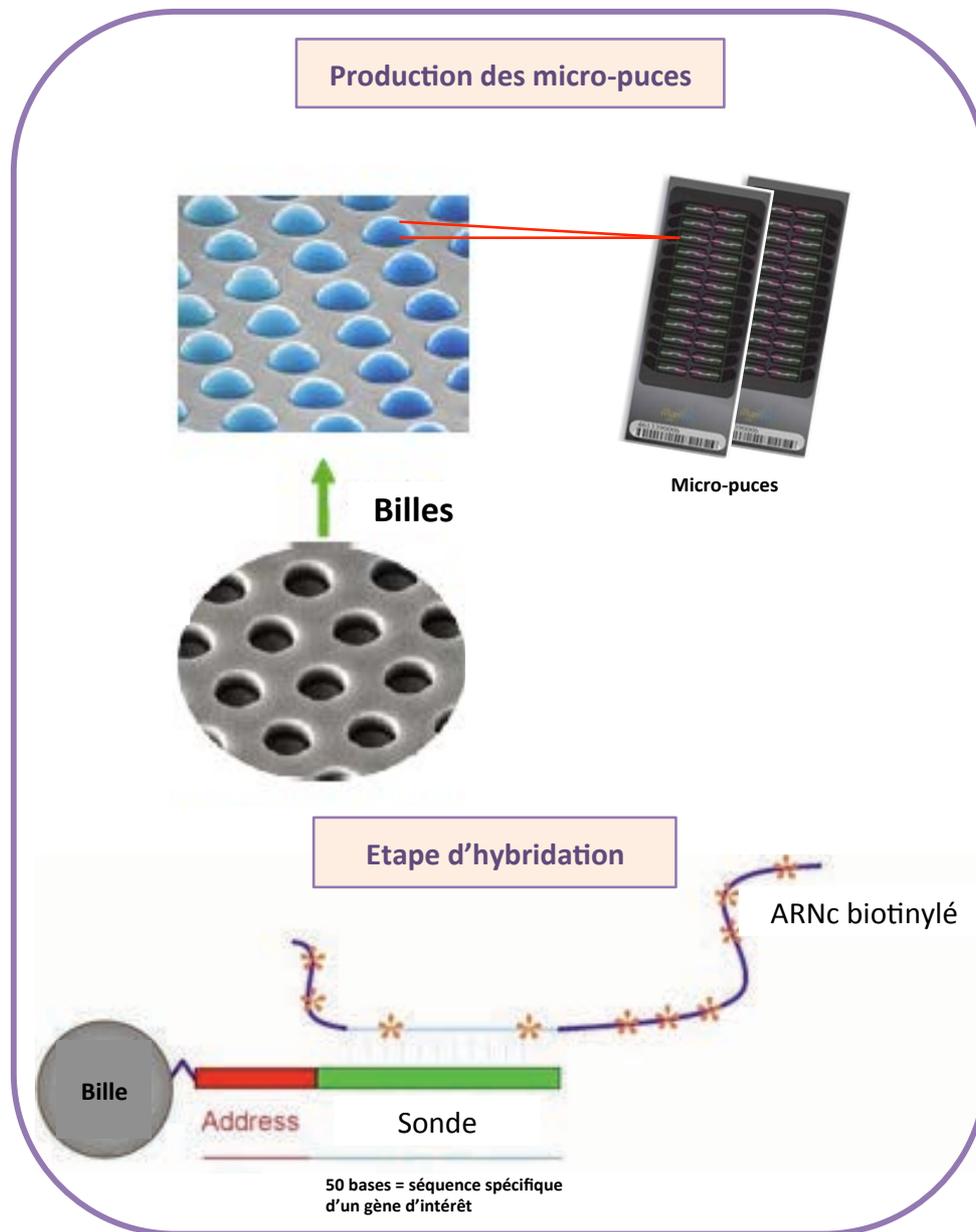
Cette méthode, complexe, étant sujette à de nombreux biais techniques, il est nécessaire de passer par des étapes de prétraitement des données brutes avant de procéder à des analyses comparatives. Cette partie du projet à savoir, le nettoyage, la filtration et la normalisation des données a été réalisée en collaboration avec une équipe de bio-informaticiens au sein de notre laboratoire.

### **1. Contrôle qualité**

Cette étape de contrôle qualité des puces permet d'éliminer les puces défectueuses sur la base des valeurs de signal des sondes contrôles et de la distribution des données.

### **2. Normaliser ... pour comparer**

La normalisation est nécessaire dans la mesure où l'on compare les échantillons entre eux et que l'on veut minimiser les variations liées à la technique (expérimentateur, date, température, qualité et quantité d'ARN extrait..). Un grand nombre de méthodes de normalisation ont été développées. *Quackenbush et al.* ont passé en revue des méthodes de normalisation et ont conclu qu'il n'y a pas une méthode universelle mais plutôt une méthode adaptée à chaque cas (Quackenbush, 2002). Nos données ont été normalisées grâce à la méthode des quantiles puis log-transformées.



**Figure 11.** Principe des puces Illumina : des billes sur lesquelles sont attachées les sondes sont dispersées aléatoirement sur une lame

Les micro-puces Illumina (Illumina BeadArray) basent leur principe sur l'utilisation de billes (de 3 microns) se trouvant dans des puits et qui peuvent contenir des plus de 46 000 de copies de sondes spécifiques de 50 bases pour une série de gènes d'intérêt.. Cette technologie, consiste en la transformation des ARN extraits en ADN complémentaires (ADNc) puis en une étape de transcription *in vitro* qui permet l'obtention d'ARNc. La synthèse d'ADNc et la transcription *in vitro* sont suivies de l'hybridation avec les billes. Les billes sur lesquelles sont attachées les sondes sont dispersées aléatoirement sur une lame Les images des puces sont ensuite révélées en utilisant le lecteur d'Illumina et les données sont ensuite traitées grâce au logiciel *Illumina BeadStudio* prévu à cet effet.

Figure adaptés à partir de <http://www.illumina.com/technology/beadarray-technology.ilmn>.

La raison pour laquelle nous avons choisi cette méthode de normalisation parmi de nombreuses méthodes disponibles vient d'une étude réalisée par *Schmidt et al.* qui ont comparé 25 méthodes de prétraitement de données (normalisation) de micro-puces Illumina, incluant les méthodes proposées par le logiciel *illumina BeadStudio software*. Ils ont testé l'efficacité ces 25 méthodes en regardant 9 paramètres (que je ne développerai pas car trop techniques) et ils ont attribués un score à chaque méthode pour un paramètre donné. La méthode des quantiles sans suppression de bruit de fond et associée à la log-transformation s'est révélée être la méthode idéale pour ces données. (Schmid et al., 2010).

### **3. Filtrer... Pour éliminer les parasites**

Après avoir été normalisés, les données vont être filtrées. Cette étape de filtration des sondes va nous permettre de retirer les sondes détectées qui viendraient induire de l'information parasite en ne gardant que les sondes détectées dans les deux tiers des échantillons d'au moins un groupe expérimental. Nous considérons ici que les souris d'un même groupe sont suffisamment semblables pour émettre l'hypothèse que leur transcriptome est très similaire.

### **4. La variabilité, un facteur crucial ... Contrôle qualité**

Une fois les données nettoyées, il convient d'analyser la variabilité au sein des groupes d'intérêt. Pour ce faire, plusieurs algorithmes permettant d'apprécier la variabilité inter- et intra-groupes ont été développées à travers les années.

Nous utilisons l'Analyse en Composantes Principales (ACP), comme méthode exploratoire pour le contrôle qualité des données et pour l'analyse des données normalisées, et la Principal Variance Component Analysis (PVCA) qui va servir à valider l'étape de normalisation.

#### **a. L'ACP ... ou comment réduire les dimensions**

L'analyse en composantes principales ou ACP a été développée en France dans les années 1960 par *J- P. Benzécri*. Il s'agit d'une méthode statistique exploratoire permettant de réduire le nombre de dimensions de l'espace des données, en retenant le maximum d'informations contenues dans les données d'origine. Autrement dit, elle permet de visualiser sur un repère à 2 dimensions des individus caractérisés par des milliers de variables.

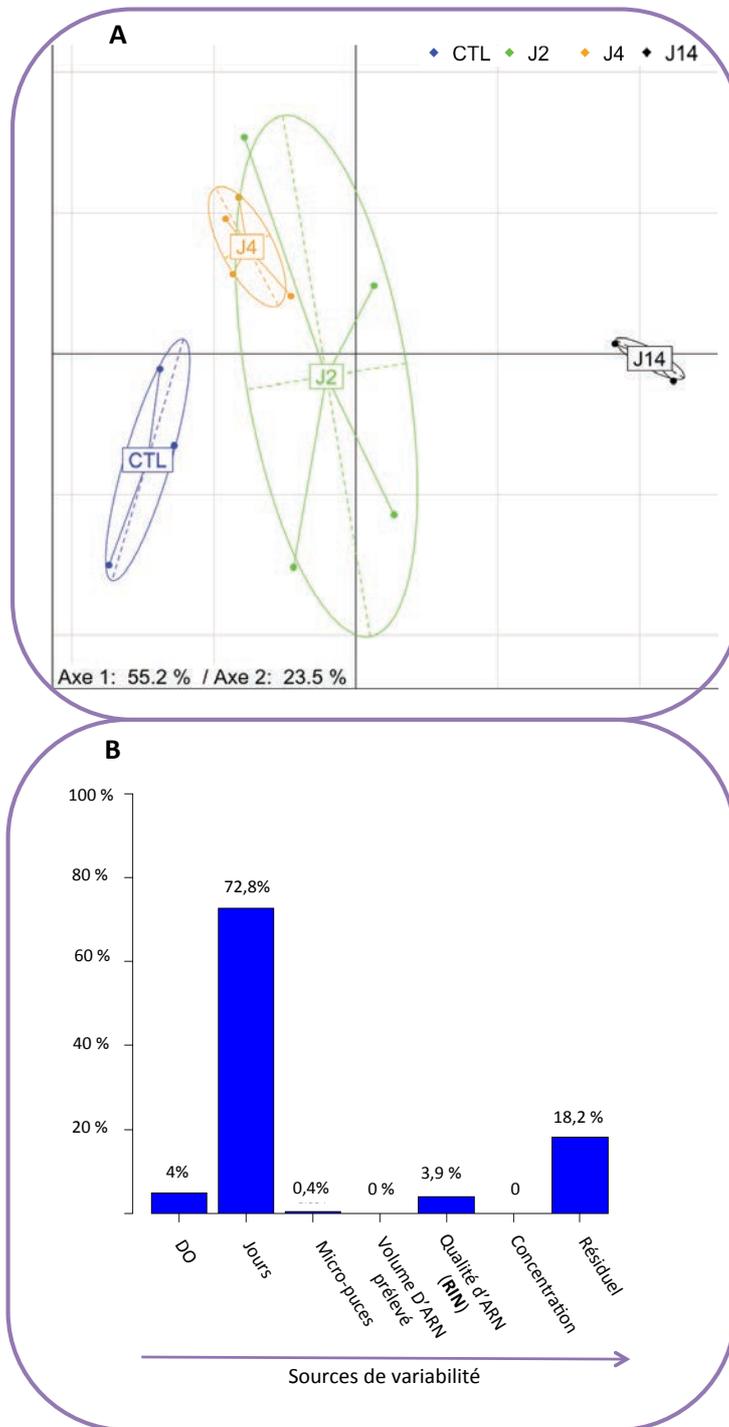
En effet, les données transcriptomiques décrivent chaque individu (ou échantillon) par environ 30 000 variables (chaque variable représente la valeur d'expression d'un gène donné). Bien évidemment, aucune représentation graphique simple ne permet de visualiser chaque individu dans un espace à 30 000 dimensions. L'ACP propose donc une représentation dans un espace de dimensions réduites, appelées composantes principales - généralement aux nombres de deux ou trois. Chaque composante restituant un certain pourcentage de la

variabilité initiale, l'ACP permet ainsi de mettre en évidence d'éventuelles structures au sein des données (Figure 12) et nous a donc permis de pouvoir apprécier la variabilité entre les groupes expérimentaux au sein de nos données.

#### **b. PVCA ... ou comment identifier les sources de variabilité**

La Principal Variance Component Analysis (PVCA) a été développée par *Li et al* (Li and Bushel, 2014). C'est un algorithme composé de la fusion de deux méthodes statistiques (ACP + VCA). Sans rentrer dans les détails techniques de cet algorithme complexe, PVCA permet d'apprécier le poids des sources de variabilité connues au sein d'un jeu de données d'intérêt. Parmi les différentes sources de variabilité, on retrouve la qualité des transcrits, la position dans la puce ou encore le volume prélevé. L'identification de sources de variabilité s'appuie sur les métadonnées recueillies tout au long de l'étude (expérimentateur, date, volumes..), connues par l'expérimentateur. Le poids de la variabilité restée inexplicite est représenté par la catégorie notée résiduelle (Figure 12).

Les étapes de normalisation, filtration et de vérification de la variabilité ont été réalisées grâce au logiciel R (<http://www.r-project.org/>), une plateforme de développement scientifique spécialisée dans le calcul et l'analyse statistique.



**Figure 12.** Contrôle qualité des échantillons en utilisant L'ACP (Analyse en Composantes Principales) et PVCA (Principal Variance Component Analysis).

**A.** l'ACP a été appliquée à un jeu de données transcriptomique, pris à titre d'exemple, composé de 4 groupes (CTL, J2, J4 et J14), chaque groupe contenant 4 souris (ou échantillons). L'ACP a permis la réduction des quelques 30 000 dimensions représentant l'expression génique au sein de chaque échantillon à deux dimensions, ou composantes principales, expliquant 78% de la variabilité totale. Cela autorise et rend plus abordable l'analyse de la variabilité existante entre les groupes, ici CTL, J2, J4 et J14 (ou variabilité intergroupe) et la variabilité au sein du même groupe (variabilité intra-groupe).. CTL = Groupe de souris contrôles. J2 (4, ou 14) = souris à 2 (4, ou 14) jours après l'injection des cellules tumorales.

**B.** Etude quantitative de la contribution du poids de chaque source de variabilité potentielle (facteur connu par l'expérimentateur) au sein du jeu de données par la méthode PVCA.

### III. Méthodes d'analyse des données transcriptomiques

#### 1. Analyse différentielle ... Gènes différentiellement exprimés (GDE)

Une fois les données normalisées et éventuellement corrigées, le premier pas vers l'analyse de transcriptome est la mise en évidence des gènes différentiellement exprimés entre deux conditions distinctes. Pour mesurer cette différence, il faut pouvoir distinguer les variations biologiques, reflet du fonctionnement de la cellule, des variations expérimentales qui peuvent polluer l'interprétation des données.

Différentes méthodes ont été développées pour déterminer les GDE (Le Meur et al., 2004), on distingue les tests paramétriques des tests non paramétriques.

##### c. Les tests non paramétriques

Dans le cas d'un test non paramétrique, aucune distribution sous-jacente aux données n'est supposée au départ. C'est utile pour les petits effectifs où il n'est pas possible de déterminer une loi de distribution (Hunter et al., 2001). Parmi ces tests non paramétriques, le test des signes de Wilcoxon, le test de Mann Withney et l'analyse SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher et al., 2001).

##### d. Les tests paramétriques

Dans le cas d'un test paramétrique, les niveaux d'expression normalisés d'un gène à travers les échantillons sont supposés suivre un modèle probabiliste, comme par exemple un modèle gaussien (Long et al., 2001) ou un modèle de Gamma-Gamma-Bernoulli (Newton et al., 2001). Un test statistique est ensuite appliqué, en général un t-test (Greller and Tobin, 1999), pour savoir dans quelle mesure les taux d'expressions d'un gène donné sont conformes au modèle.

Pour nos données nous avons utilisé un test paramétrique, le test de BAYES (eBayes), une version modifiée du *t*-Test. En effet, *Jeanmougin et al* ont réalisé une étude comparative des différentes méthodes d'analyse et de génération des GDE et ont conclu que l'eBayes est la méthode la plus fiable et la plus robuste.

Pour nos données nous avons utilisé une version modifiée du t-Test (eBayes). En effet, comparé aux tests différentiels comme VarMixt, RVM, SMvar, Wilcoxon, t-test, ... ce test est le plus robuste aussi bien pour les échantillons de petite taille que les échantillons de grand taille (Le Meur et al., 2004).

De plus, il faut prendre en compte le fait qu'un grand nombre de tests statistiques sont effectués, ce qui augmente considérablement la probabilité de faire une erreur

d'identification. Des travaux ont été réalisés afin de contrôler cette probabilité d'erreur. Benjamini et Hochberg ont notamment proposé une mesure appelée FDR pour False Discovery Rate, qui permet de contrôler le taux d'erreurs attendu (Hochberg and Benjamini, 1990). Une fois que les gènes différentiellement exprimés (GDE) sont sélectionnés, l'étape qui suit est une étape de classification des profils d'expression de ces GDE.

## **2. Classification des profils d'expression**

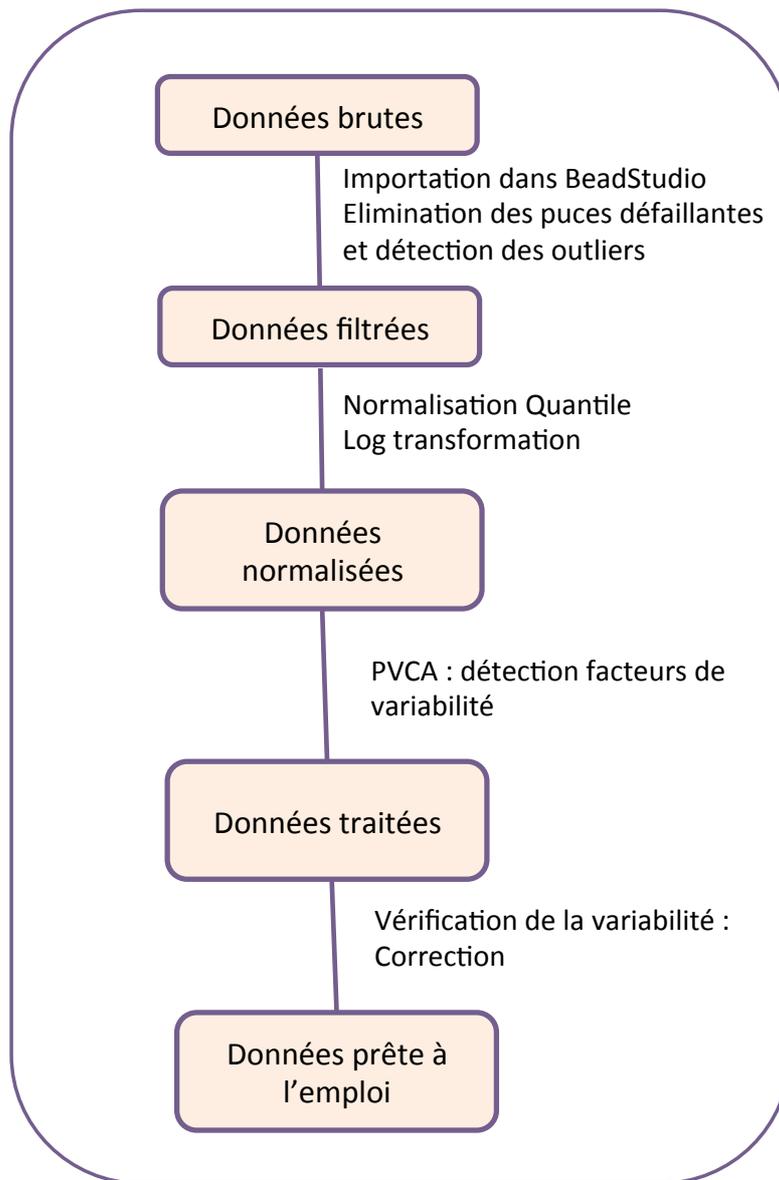
### **a. Méthodes supervisées**

Les méthodes supervisées utilisent la connaissance *a priori*. Elles établissent des règles et un modèle de classification à partir d'un jeu de données annotées, ou jeu d'apprentissage, pour ensuite prédire la classification de nouveaux cas appartenant à un jeu de données test. Elles sont qualifiées de prédictives. Par exemple, ce type d'approches, permet de prédire la classe d'une tumeur en fonction de son profil d'expression. Nous n'avons pas utilisé de méthodes supervisées pour classer nos données.

### **b. Méthodes non supervisées**

Contrairement aux méthodes supervisées, ces méthodes cherchent à établir des groupes stables et homogènes de gènes ou échantillons sans *a priori*. Elles sont qualifiées d'exploratoires, nécessitent une validation indépendante et sont essentiellement employées pour la découverte de classes. La classification des données d'expression consiste à regrouper les gènes sur la base de leur profil d'expression. De manière générale, les algorithmes utilisés se basent sur le calcul de la similarité ou de la dissimilarité entre les éléments (Gilbert et al., 2000). Il existe également des solutions basées sur des environnements de développement, très flexibles puisque particulièrement bien adaptées à l'ajout de modules (ou plug-in), mais nécessitant une certaine expertise de la part des utilisateurs. Citons notamment, Matlab®, SAS® ou plus récemment la suite BioConductor (Gentleman et al., 2004) de l'environnement R (Ihaka and Gentleman, 1994), une suite intégrée de logiciels pour mener des analyses statistiques et graphiques sur des données génomiques.

Pour nos données nous avons utilisé que des méthodes de classification non supervisée tels que les classifications hiérarchiques avec distance euclidienne et méthode d'agrégation de Ward ou complète. Je ne rentrerai pas dans les détails techniques de ces méthodes car elles ne sont pas l'objet principal de l'analyse, de plus cette partie a été réalisée par des bio-informaticiens au laboratoire.



**Figure 13. Processus de pré-traitement des données.**

Une fois exportées grâce BeadStudio®, les données brutes ne peuvent être exploitées avant de subir plusieurs étapes de « nettoyage ». Dans un premier temps les sondes défectueuses sont éliminées ainsi que les potentiels « outliers », ensuite les données sont normalisées par la méthode Quantile et log transformées. Ensuite, PVCA va être utilisé afin d'apprécier la variabilité au sein du jeu de données. Des corrections peuvent être apportées si nécessaire et surtout si possible.

### 3. Comment se servir des signatures moléculaires ?

En plus de la sélection et l'analyse des GDE, nous nous sommes intéressés aux réseaux de gènes. Pour cela, nous avons généré de manière non supervisée des signatures moléculaires. Chaque signature moléculaire est définie par un ensemble de gènes dont le comportement varie de manière fortement corrélée en fonction des conditions ; les gènes d'une même signature sont souvent impliqués dans la même voie de signalisation.

Par ailleurs, il y a deux façons de se servir des signatures moléculaires, la première consiste en l'utilisation des signatures issues de la littérature (et des bases de données GO et KEGG par exemple), la seconde réside dans le développement d'une stratégie permettant de les générer.

#### a. Utiliser des signatures issues de la littérature

La littérature regorge de signatures moléculaires. Elles sont issues des différentes expériences réalisées dans le cadre d'études transcriptomiques, protéomiques ou encore métaboliques comparatives. Ces signatures sont dites « prêtes à l'emploi » et sont disponibles à partir des bases de données en ligne telles que GO (Gene Ontology) ou la base de signatures GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). GO n'est pas une base de données à proprement dit, c'est une ontologie décrivant les listes de gènes impliqués dans les processus biologiques qu'elle recense.

Par ailleurs, *Chaussabel et al* ont défini et mis en ligne des modules de gènes spécifiques à différentes voies de signalisation et sous-population cellulaires telles que « activation immunitaire », ou encore « Signature des marqueurs de surface des cellules dendritiques » (Chaussabel et al., 2008). (<http://www.immuneprofiling.org/meni/meni-paper/btm-landing.gsp>).

De la même manière, *Pulandran et al* ont mis en évidence des signatures moléculaires leur permettant de prédire la réponse immunitaire au vaccin contre la grippe et la fièvre jaune (Querec et al., 2008). De manière plus globale, toute publication ayant trait à l'analyse d'omiques peut être source de signatures moléculaires potentiellement intéressantes pour être testées sur le jeu de données d'intérêt.

#### b. Ou générer de nouvelles signatures spécifiques... ICA → GSEA

Au laboratoire, *Pham et al* ont développé une méthode permettant d'extraire des signatures moléculaires spécifiques d'un jeu de données d'intérêt, c'est la méthode ICA → GSEA (Pham et al., 2014). Brièvement, cette méthode originale combine, comme son nom l'indique, deux algorithmes qui permettent d'une part d'extraire des signatures moléculaires de manière non-

supervisée (ICA - Independent Component Analysis) et de tester la significativité des signatures ainsi extraites lors d'une comparaison entre deux conditions (GSEA - Gene Set Enrichment Analysis) (Figure 14).

### *ICA ... Ou comment extraire des signatures moléculaires*

#### *Origines*

La «séparation des sources en aveugle» est un domaine en plein essor dans la communauté du traitement du signal. En effet, de nombreuses méthodes statistiques, ont été proposées afin de résoudre ce problème. Pour résumer ce que fait ICA, on donne souvent l'exemple des « capteurs ». Supposons que l'on dispose de plusieurs capteurs dans une même pièce recevant des signaux de sources proches mais distinctes. Chaque capteur reçoit un mélange des signaux sources : on appelle ce mélange le « signal mesuré ». Cependant, la proportion des signaux dans le mélange qui n'est pas connue. Or, avec les méthodes de séparation de sources, on cherche à retrouver les signaux sources. La séparation est dite « en aveugle » car l'on ne dispose d'aucune information propre aux signaux sources. Les premiers auteurs à avoir exposé ce problème de séparation de source, sont **Herault et Jutten** (Herault and Jutten), dans leurs travaux neurobiologiques, qui avaient pour objectif d'étudier les réponses musculaires émises en réponse à différentes sortes d'excitation. Par la suite, plusieurs travaux ont vu le jour et ont abouti à l'ICA. **Hori et ses collègues** ont été les premiers à proposer un procédé de classification de gènes basé sur ICA. Ce procédé avait pour but de classer de manière efficace des données d'expression de gènes de levure en groupes biologiquement pertinents (Hori and Inoue, 2001). **Liebermeister et al** ont proposé l'utilisation d'ICA dans l'analyse de données transcriptomiques afin d'extraire des « modules d'expression » de sorte que chaque module représente une influence linéaire d'une variable cellulaire cachée (Liebermeister, 2002). A partir de ces développements, ICA a été largement utilisée pour l'extraction de signatures moléculaire, classification et clustering des gènes.

#### *Application aux données transcriptomiques*

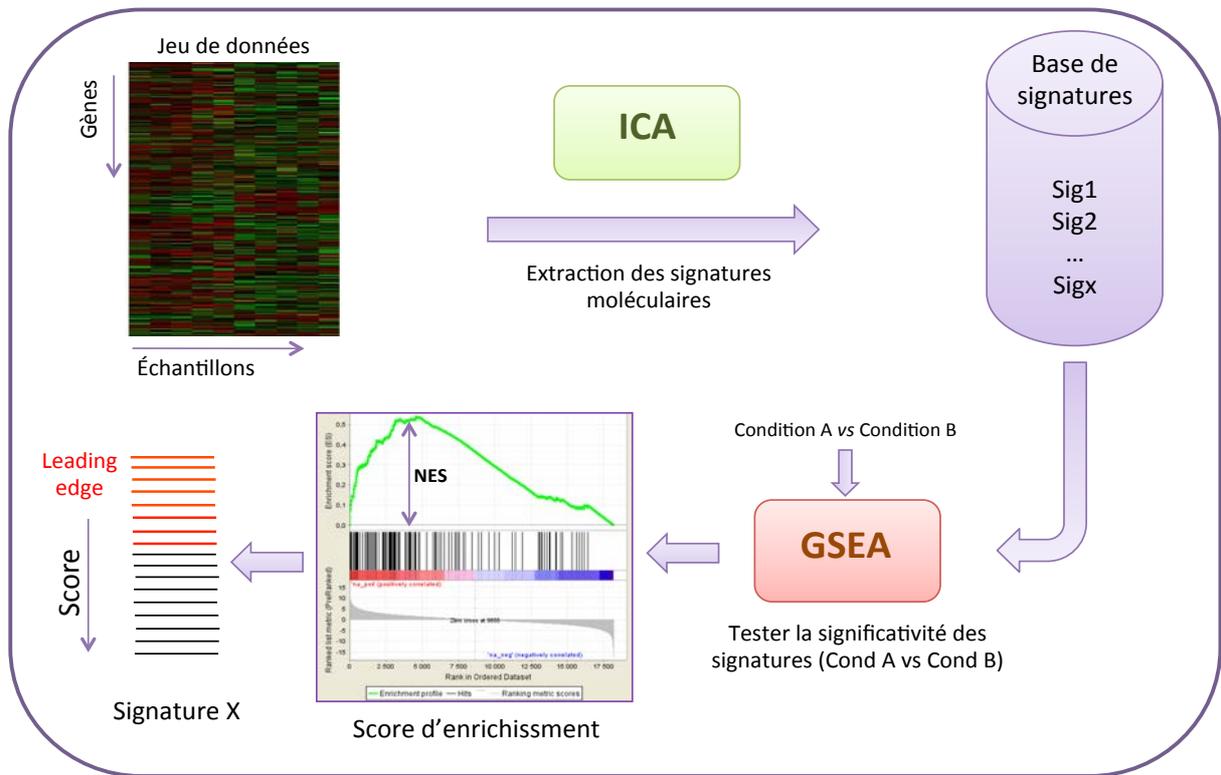
Le niveau d'expression d'un gène donné pouvant être la résultante de plusieurs phénomènes (boucles de régulation, gène inhibiteur,...), ICA permet d'identifier les gènes dont les variations d'expression sont corrélées à travers tout le jeu de données. En tant que méthode non-supervisée, l'ICA ne requiert aucune connaissance a priori concernant la structure de données à analyser. Les signatures moléculaires ainsi produites sont stockées dans une base de données de signatures, comprenant aussi les signatures issues de la littérature.

### ***Facteurs limitants***

Les facteurs limitants d'ICA sont d'une part la taille des groupes expérimentaux étudiés car le nombre de signatures pouvant être extraite est directement dépendant du nombre d'échantillons du jeu de données. On comprend alors l'importance de prévoir un nombre d'échantillons suffisamment grand lors du design de l'expérience. L'autre facteur limitant est la qualité des données (signal), ceci donne tout son sens aux étapes de contrôle qualité, de filtration et de normalisation.

### ***GSEA ... La signature X permet-elle de distinguer les conditions A et B ?***

GSEA (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) est un algorithme permettant de déterminer si une signature moléculaire définie *a priori* est significativement enrichie pour une comparaison entre deux états biologiques. Cet algorithme a été développé par **Mootha et al** (Mootha et al., 2003) afin d'interpréter les résultats d'analyse différentielle à l'aide de différentes sources d'information biologique, puis adapté par **subramanian et al** (Subramanian et al., 2005). Brièvement, GSEA prend en données d'entrée une liste de gènes ordonnés selon la statistique d'eBayes et une liste de signatures moléculaires. Il produit un score d'enrichissement, une p-value et une q-value (p-value corrigée pour les tests multiples) pour chaque signature. Seules les signatures significatives (q-value < 0.01) sont retenues et analysées par la suite (Figure 14).



**Figure 14. La stratégie ICA → GSEA.**

A partir des jeux de données produits, des signatures moléculaires sont générées grâce à ICA (Independent Component Analysis), ce qui permet de construire une base de signatures. Afin de tester la significativité des signatures produites pour chaque condition, on utilise le score d'enrichissement (NES) du logiciel GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Chaque signature ainsi obtenue représente un ensemble homogène de gènes ayant un comportement global identique, la courbe verte représente la somme cumulée des scores d'enrichissement de chaque gène (représentés par des traits verticaux noirs). Dans le segment de gauche, en rouge sont représentés les gènes qui participent le plus à l'enrichissement de la signature, ces gènes sont regroupés sous le nom de « leading edge ».

#### **IV. Annotation fonctionnelle des données transcriptomiques**

De façon générale, l'annotation consiste à relier des gènes ou des protéines aux processus cellulaires (cycle cellulaire, mort cellulaire, embryogenèse, métabolisme, système immunitaire...). Dans notre cas, nous allons annoter des gènes.

##### **1. Comment annoter les GDE ?**

Afin de sélectionner les GDE, nous avons utilisé le test statistique eBayes, il accorde à chaque gène une valeur statistique qui renseigne sur le sens de la modulation du gène d'intérêt, une valeur positive signifie que le gène est up-régulé entre les deux conditions alors qu'une valeur négative signifie qu'il est down-régulé. Les GDE sont triés en fonction de la valeur de la p-value ajustée par Benjamini-Hochberg (FDR), seuls les gènes avec des p-value inférieure à au moins 0,05 (ou 0,01 si plus de 3000 GDE) seront retenus pour analyse.

Il existe de nombreuses façons d'analyser les listes de gènes à savoir les GDE mais aussi les signatures moléculaires. Ils peuvent être annotés soit à la main (annotation manuellement) c'est à dire gène à gène, ou bien à l'aide d'outils d'annotation automatique qui s'appuient sur les connaissances disponibles au niveau des différentes bases de données.

##### **a. Annotation manuelle**

L'annotation manuelle (ou gène à gène) requiert un aller-retour constant à la littérature, or les données sont en constante évolution. Ce type d'annotation peut être utile dans la mesure où l'on va extraire toutes les informations contenues dans le jeu de données. Cependant, cette tâche est d'une extrême lenteur et nécessite donc beaucoup de temps et d'énergie. De plus, le point critique de ce type d'annotation est que le choix des gènes à analyser est complètement biaisé par l'expert et l'expérimentation. D'où la nécessité d'une automatisation des annotations.

##### **b. Annotation automatisée**

L'annotation automatisée s'appuie sur la bioinformatique et présente donc l'énorme avantage d'être rapide et d'apporter beaucoup de facilité. Elle utilise les différentes bases de données génomiques. Il est important de distinguer l'Ontologie GO (Gene Ontology) et les outils d'annotation utilisant cette base. Je vais d'abord présenter GO puis les outils.

##### ***Bases de données***

Etant donné le nombre sans cesse grandissant de bases de données, il m'est impossible de détailler toutes les bases de données existantes, je vais donc me concentrer sur les bases que j'ai utilisées au cours de mes projets qui sont également celles qui sont le plus utilisées en biologie, GO et KEGG.

## ***Gene Ontology (GO)***

GO (<http://www.geneontology.org/>) a été développée par le Gene Ontology Consortium (Ashburner et al., 2000, Gene Ontology Consortium, 2001). Le projet a été lancé en 1998 avec pour objectif la mise en place un vocabulaire structuré, contrôlé et dynamique pour décrire la fonction des gènes et des produits de gènes de l'ensemble des eucaryotes (Smith et al., 2003a).

GO est composée de trois hiérarchies de vocabulaires contrôlés qui décrivent les produits de gènes par leur association à des fonctions moléculaires (*molecular\_function*), des processus biologiques (*biological\_process*) et des localisations cellulaires (*cellular\_component*). Chacune de ces trois hiérarchies est structurée sous la forme d'un graphe orienté acyclique ou DAG (Directed Acyclic Graph) ((Smith et al., 2003b)). Ce graphe constitue un réseau où chaque nœud représente un terme GO qui est identifié sous la forme GO: xxxxxx (ex. : « immune complex clearance » est identifié GO: 00002434). Chaque terme est un *enfant* de un ou plusieurs *parents* et la relation entre un terme *enfant* et un terme *parent* peut être du type *is\_a* (« est un »), *part\_of* (« fait partie de ») ou *regulates* (« régule »). Les termes *enfants* peuvent avoir différentes relations avec leurs différents *parents*. Au final, plus l'on descend dans la l'ontologie, plus les termes sont spécialisés et précis (Figure 15). A chaque terme est associé un numéro d'accès ainsi qu'une définition détaillée et on compte à ce jour (version de mai 2014) 40885 termes dans la base GO applicables à un grand nombre d'espèces.

## ***Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)***

KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>) (Kanehisa et al., 2008) est une collection de banques de données initiée en 1995 par le *GenomeNet Database Service du Kanehisa Laboratory* à l'université de Kyoto dans le cadre de l'*Human Genome* program lancé par le Ministère de l'éducation, de la culture, des sports, des sciences et des technologies japonais. KEGG se définit comme une « base de données orientée vers la biologie des systèmes permettant la compréhension des mécanismes et des concepts fonctionnels complexes de la cellule ou d'un organisme à partir de son génome.

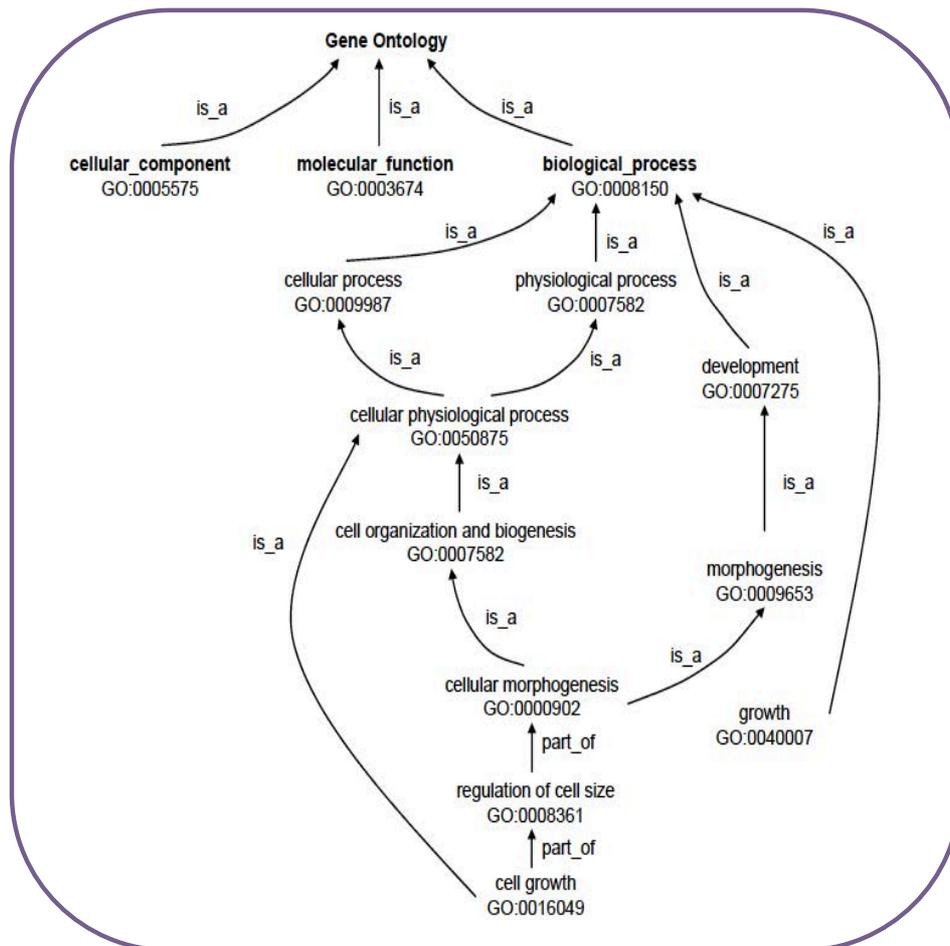
KEGG est constituée de quatre banques principales, connectées entre elles et jouant le rôle de points d'entrée pour aboutir aux autres sous-banques qui les composent :

- PATHWAY est une base de connaissances de voies métaboliques dessinées manuellement et de voies non métaboliques générées automatiquement,
- BRITe est l'ontologie de tous les concepts et connaissances présents dans KEGG,
- GENES est un catalogue de gènes de plusieurs génomes complets,

- LIGAND est catalogue de substances chimiques et de réactions qui interviennent dans le domaine de la vie

Chacune des banques de KEGG est conçue pour être représentée sous forme de graphes dont les entrées sont les nœuds et les relations biologiques les arêtes.

Néanmoins, l'une des limites de KEGG est le manque de références à la littérature, la majeure partie des données est issue de prédiction et de déduction à partir de comparaisons inter-organismes et inter-voies. En outre, il existe de nombreux problèmes de consistance des données liés à la structure même de KEGG (Wittig and De Beuckelaer, 2001).



**Figure 15.** Extrait du graphe orienté acyclique de Gene Ontology (GO). Le graphe GO a pour origine les trois ontologies « molecular\_function », « biological\_process » et « cellular\_component ». Les mentions *is\_a* (« est un ») ou *part\_of* (« fait partie de ») indiquent le type de relation entre les termes parents et enfants. Par exemple, le terme « cellular physiological process » (GO:0050875) a deux termes parents, « cellular process » (GO:0009987) et « physiological process » (GO:0007582). Plus l'on descend dans l'ontologie, plus les termes sont spécialisés et précis.

## ***Outil d'annotation***

### ***L'outil d'annotation utilisant la base GO***

La Gene Ontology figure parmi les ontologies les plus utilisées en biologie, ce qui a favorisé son acceptation et son intégration par les banques majeures de données biologiques. De nombreux outils d'annotation automatique ont été développés. ***Galon et al*** ont mis en place un outil ClueGO qui est très utilisé (Bindea et al., 2009). Cet outil sera abordé dans la partie consacrée à cytoscape (IV-2-e). Dans la stratégie que j'ai développée, j'ai utilisé la base des termes GO (ayant un nombre de gènes supérieur à 7) comme signatures moléculaires. On verra dans la partie « analyse de signatures » comment cela a été intégré au sein de la stratégie générale.

### ***Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (David)***

DAVID (Dennis et al., 2003, Huang et al., 2009) regroupe un ensemble d'outils Web destinés à l'annotation fonctionnelle de listes de gènes à l'aide de sa propre banque de données, *DAVID knowledgebase*. Cette dernière intègre les identifiants de gènes ou protéines de plusieurs espèces, ainsi que leur annotation, au travers d'une grande variété de banque de données publiques (NCBI, PIR, SWISS - PROT, GO, OMIM, PubMed, KEGG, BIOCARTA, AffyMetrix, TIGR, Pfam, BIND, MINT, DIP ...). Les outils fournis par DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) permettent l'analyse des listes de gènes fournies par l'utilisateur via des outils d'annotation fonctionnelle (enrichissement en catégories fonctionnelles, cartographie sur les voies métaboliques,...) et de classification fonctionnelle des gènes (regroupement de gènes ayant une annotation fonctionnelle similaire). Dans nos études, nous avons utilisé l'outil d'analyse des enrichissements fonctionnels dans plusieurs listes de gènes

### ***Ingenuity Pathways Analysis (IPA)***

Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>) est une suite applicative Web commerciale permettant de modéliser et d'analyser des systèmes biologiques et chimiques complexes. IPA propose différents types d'analyses :

- « *IPA Core Analysis* » : interprétation de jeux de données dans le contexte de processus biologiques, de voies métaboliques et de réseaux moléculaires
- « *IPA-Metabolomics Analysis* » : analyse de la physiologie et du métabolisme cellulaire
- « *IPA-Tox Analysis* » : analyse de la toxicité de composés chimiques dans le contexte de phénotypes et de pathologies cliniques

- « *IPA-Biomarker Analysis* » : permet de prioriser les molécules actives en fonction de leurs effets sur des maladies dans le cadre de candidats de médicaments

Nos listes de gènes ont donc été analysées en parallèle avec *DAVID* et *IPA-Core Analysis*

L'énorme avantage de cet outil est que sa base de données est garantie et fiable grâce à une curation manuelle et automatique des interactions entre les gènes.

## **2. Comment annoter les signatures moléculaires ?**

Nous avons utilisé deux types de signatures : (i) des signatures moléculaires issues de la littérature (signatures produites par le groupe de **Damien Chaussabel** (Chaussabel et al., 2008) par exemple), des bases de données disponibles en ligne (essentiellement les signatures GO), (ii) des signatures issues de la stratégie ICA → GSEA appliquée sur le jeu de données d'intérêt. Nous verrons par la suite que les informations fournies par les deux types de signatures corrélaient très bien. Une fois, extraites ces signatures doivent être analysées et pour cela, nous pouvons procéder à une analyse individuelle (signature à signature), il est possible aussi d'analyser la globalité des signatures au moyen de logiciels adéquats.

### **a. Analyse individuelle ... signature par signatures**

Une signature moléculaire étant composée d'une liste de gènes ayant le même comportement biologique, elles sont analysées de la même façon que les GDE.

### **b. Analyse globale ... réseaux fonctionnels**

Les signatures moléculaires peuvent être analysées de façon globale, c'est dire via la production des réseaux de signatures qui sont enrichies au sein d'un jeu de données d'intérêt. Cela a été possible grâce au logiciel cytoscape (<http://www.cytoscape.org>) et son plugin Enrichment map.

### **c. Qu'elles sont les fonctionnalités de Cytoscape ?**

Cytoscape est un logiciel permettant de visualiser les réseaux d'interactions moléculaires et les voies métaboliques, avec leurs annotations, leurs profils d'expression ou d'autres attributs associés. L'interface Cytoscape a été initialement développée pour la recherche en biologie, c'est désormais une plate-forme générique pour la visualisation et l'analyse de réseaux complexes (Shannon et al., 2003).

### ***Comment ça marche ?***

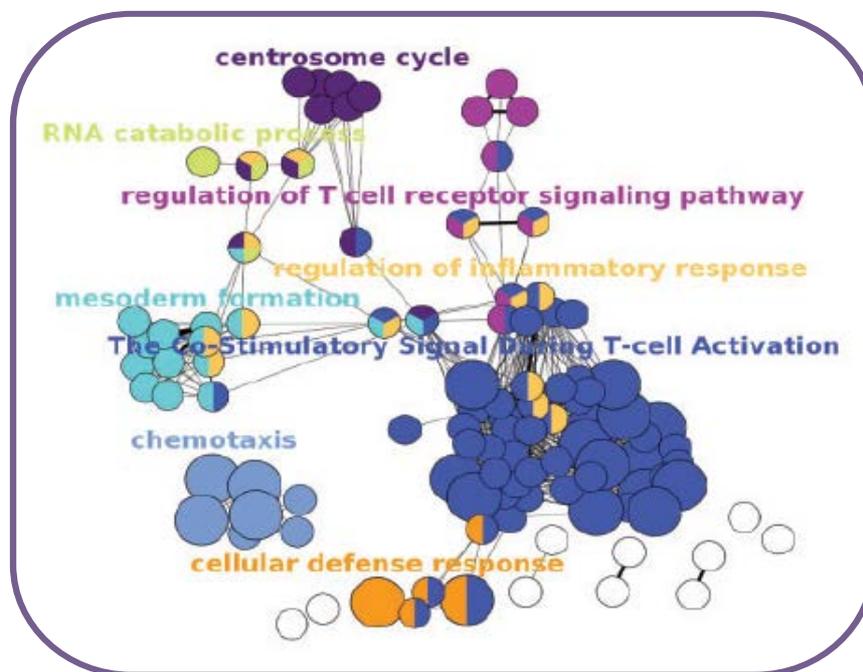
La distribution Cytoscape core fournit des outils de base pour l'intégration de données et leur visualisation. Des fonctionnalités avancées sont mises à disposition sous forme de plugins.



### Autres plugins intéressants

Comme mentionné plus haut, il existe plusieurs plugins utilisant l'interface Cytoscape permettant d'annoter fonctionnellement une liste de gènes (GDE ou signatures) parmi lesquels BINGO (Maere et al., 2005), PINGO (Smoot et al., 2011) et ClueGO (Bindea et al., 2009). *Saito et al.* ont rédigé une revue publiée dans *Nature methods* consacrée aux meilleurs plugins Cytoscape. Ils décrivent brièvement leur utilité dans les domaines de l'annotation, la visualisation et classification des données à haut débit (Saito et al., 2012).

ClueGo a été développé par une équipe française au sein du laboratoire du docteur *Jérôme Galon*, c'est un outil permettant la visualisation de groupes de fonctions en réseau (Bindea et al., 2013). Cet outil est facile d'utilisation et permet la production de réseaux d'annotation GO ou même KEGG. Un exemple est présenté dans la Figure 17.



**Figure 17. Exemple de réseau produit grâce à l'outil ClueGO.**  
L'analyse a été réalisée sur une liste de gènes up et down régulés à partir de cellules NK récupérées de sang humain de donneurs sains. Les réseaux fonctionnels ont été groupés en fonction des termes d'annotation grâce à un score (c'est ce que les auteurs appellent le K-score, seul les termes ayant un score supérieur à 0,3 ont été pris en compte). Seuls les termes les plus significatifs sont représentés ici. La taille du nœud représente la significativité de l'enrichissement (plus les nœuds est grand plus il est significatif). Les groupes non annotés sont représentés en blanc.

*Figure adaptée de (Bindea et al., 2009)*

### **3. Complémentarité GDE / Signatures**

Nous aurons pu nous contenter d'analyser les GDE à l'aide des outils à disposition. Or, nous serions passés à côté de nombreuses informations. En effet, un gène donné peut ne pas être statistiquement modulés mais être inclus dans une signature moléculaire de façon statistique. La stratégie incluant les signatures va nous permettre d'avoir une vision systémique, s'intéressant aux réseaux et pas seulement aux gènes individuellement.

Il apparaît clair qu'appliquer les deux stratégies (GDE + signatures) en parallèle permet de tirer des conclusions robustes.

Tout l'intérêt de notre stratégie réside dans le fait qu'en s'appuyant sur ces deux stratégies nous allons avoir des informations issues de méthodes supervisées (guidées par des hypothèses biologiques), que des informations non supervisées (sans a priori).

## **Chapitre II. STRATEGIE D'ANALYSE**

J'ai développé une stratégie d'analyse originale, qui est potentiellement applicable à toutes les données transcriptomiques ayant pour objectif de comparer une condition A à une condition B. Cette stratégie est présentée dans la Figure 18. Elle est composée de plusieurs étapes toutes dépendantes les unes des autres :

### **I. Etape I : Emettre des hypothèses**

Cette étape est l'étape la plus importante car elle détermine le type d'analyses et de comparaisons qui seront mises en œuvres.

Durant cette étape et à l'issue d'une discussion entre l'expérimentateur, le bio-informaticien et le statisticien, les groupes expérimentaux sont définis, les effectifs biologiques sont déterminés et la stratégie d'analyse validée. En effet, les données qui seront générées sont fortement corrélées à la définition des groupes biologiques et particulièrement le ou les groupe(s) contrôles(s).

Généralement, la constitution des groupes contrôles est au centre de tous les débats car idéalement il faudrait avoir un contrôle pour chaque condition mais parfois les moyens financiers ne le permettent pas. Il faut donc faire au mieux et rester cohérent.

Dans notre cas nous avons produit trois jeux de données, deux de ces jeux de données concernent l'étude du microenvironnement tumoral, le troisième portant sur l'étude de l'interface foëto-maternelle. La composition des groupes expérimentaux et les effectifs seront abordés dans la partie III

L'hypothèse générale de mon travail repose sur le fait que les cellules tumorales sont en quelque sorte protégées par le système immunitaire notamment grâce à l'intervention des cellules régulatrices. Cette protection, sans doute liée à l'origine des cellules tumorales (soi), favoriserait par conséquent de développement du cancer chez les personnes immunocompétentes. De façon parallèle, le foëtus qui contient des antigènes étrangers n'est pas attaqué par le système immunitaire de la mère et ceci grâce à l'intervention de ces mêmes cellules régulatrices. Nous nous sommes donc proposés d'étudier les phénomènes responsables de cette protection ou tolérance et de comprendre si les mécanismes mis en place dans les deux cas sont communs ou distincts.

### **II. Etape II : Générer des GDE & signatures**

Cette étape concerne la génération des listes de gènes différentiellement exprimés (GDE) et des signatures moléculaires. Ce qui est important à signaler est le fait que nous avons utilisé une méthode supervisée, orientée par l'expert ou l'expérimentateur (en connaissance de

cause) afin de générer les GDE et une méthode non supervisée (sans aucun a priori) afin de générer les signatures moléculaires.

La branche « GDE », est l'approche classique utilisée dans la plupart des études transcriptomiques publiées, elle permet l'étude « gène à gène » du phénomène étudié.

La branche « signatures moléculaires », a été mise au point au laboratoire (Pham et al., 2014), elle permet d'apprécier les mécanismes complexes telles que les boucles de régulation non-abordables par les méthodes classiques et notamment les GDE.

Notre démarche a été d'utiliser les deux approches, car ces branches sont complémentaires et parfaitement imbriquées.

### **III. Etape III : (Pré-) Traitement des données**

Une fois les données produites selon les étapes I et II, celles-ci sont nettoyées du bruit de fond associé à la variabilité technique inhérente aux approches haut-débit telle que l'analyse du transcriptome. Ceci est crucial car la variabilité observée mérite d'être analysée de plus près et le défi est d'arriver à distinguer la variabilité aux manipulations expérimentales de celle due aux phénomènes biologiques. En effet, une différence entre deux groupes biologiques donnés n'est pas systématiquement synonyme de différences biologiques. Avant de pouvoir assumer que cette différence est la conséquence de phénomènes biologiques, il est nécessaire d'apprécier la variabilité inter-groupes qui peut parfois révéler que la différence observée est exclusivement due à des biais techniques comme la qualité des échantillons, leur concentration ou encore le jour de l'expérience. Cette étape travaille donc à la distinction entre la variabilité biologiquement informative et non informative.

Les étapes II, III ont été mises en place en étroite collaboration avec les bio-informaticiens du laboratoire.

### **IV. Etape IV : Annoter**

Cette étape permet d'analyser les données normalisées ainsi que d'interpréter les résultats obtenus. Nous avons utilisé des outils d'annotation automatique tels que Ingenuity Pathways Analysis (IPA), DAVID, database et Cytoscape qui, en offrant la possibilité de visualiser les différentes voies de signalisation modulées au cours d'un phénomène biologique, fournissent en quelque sorte une image du système à un instant donné. Le choix des outils est crucial surtout qu'il y a de plus en plus d'outils de visualisation et d'annotation sur le marché. Nous avons choisi les outils les plus fiables. En effet, l'avantage d'IPA par exemple est sa base de données qui est constamment remise à jours et les nombreuses possibilités de visualisation des données d'expression. Cytoscape quant à lui offre la possibilité de créer des réseaux de signatures moléculaires.

## **V. Etape V : proposer de potentielles molécules cibles**

Idéalement, l'objectif de cette stratégie est de mettre en évidence des molécules cibles, permettant d'expliquer les hypothèses et de répondre aux questions que l'on s'est posé dans l'étape I. En effet, en s'intéressant aux gènes mais surtout aux réseaux impliqués dans un phénomène d'intérêt, nous avons pour ambition de pouvoir mettre en évidence des molécules cibles qui pourraient avoir un rôle thérapeutique.

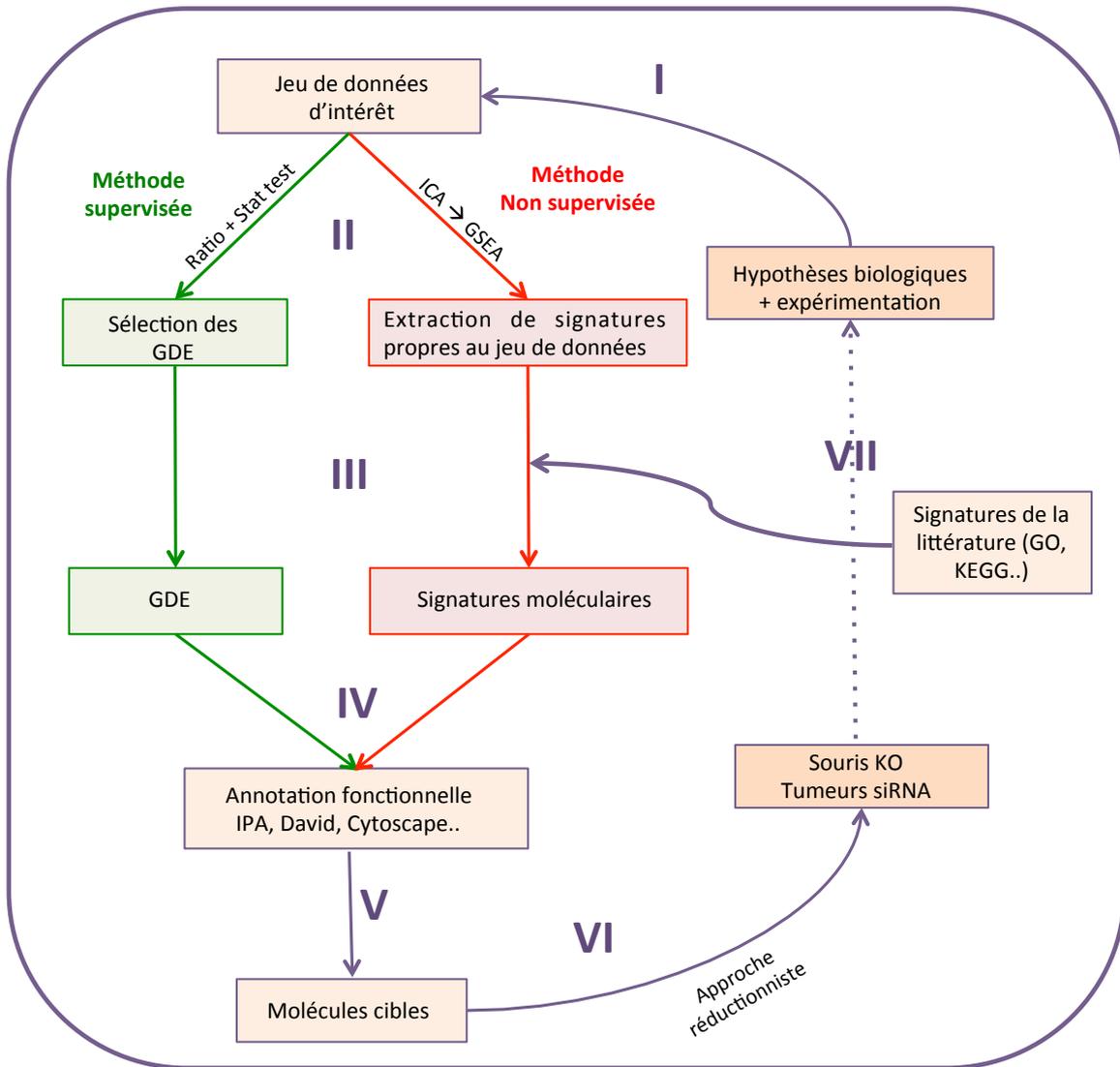
## **VI. Etape VI : Valider ces molécules cibles potentielles**

Grâce aux informations collectées par l'annotation fonctionnelle des GDE et des signatures, nous validons lors de cette étape les molécules potentiellement intéressantes pour la compréhension des hypothèses biologiques. Cette validation passe par l'expérimentation, comme par exemple l'utilisation de souris KO pour les molécules cibles ou encore l'analyse de la réponse immunitaire contre des tumeurs pour lesquelles ces molécules sont invalidées. Cette étape met en exergue toute la complémentarité entre l'approche systémique et l'approche réductionniste.

## **VII. Etape VII : On est reparti pour un tour**

D'autres données transcriptomiques peuvent être générées en utilisant les souris K-O (pour les molécules cibles) et/ou les tumeurs invalidées pour des molécules cibles et la stratégie appliquée de nouveau. Les informations récupérées seront comparées aux données initiales afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

En définitive, ma thèse a été subdivisée en deux grandes parties. La première fut consacrée, d'une part, à la mise au point de protocoles expérimentaux permettant l'obtention des données de bonne qualité (extraction d'ARN de bonne qualité à partir de tissus) et, d'autre part, au développement, avec l'aide précieuse des bio-informaticiens du laboratoire, d'une stratégie d'analyse adéquate en s'appuyant sur les nombreux outils à disposition. La deuxième partie de mon projet fut consacrée à la fouille de données à proprement parler et l'analyse des résultats.



**Figure 18.** Stratégie globale d'analyse d'un jeu de données transcriptomique. D'abord, nous avons émis une hypothèse biologique, nous avons mis en place par la suite des expériences pour vérifier cette hypothèse. Nous avons produits des données transcriptomiques (I). A partir d'un jeu de données d'intérêt, nous procédons à l'extraction des Gènes Différentiellement Exprimés (GDE) ainsi qu'aux signatures moléculaires, ces signatures moléculaires sont soit extraites via la stratégie ICA → GSEA soit récupérées des bases de données GO ou KEGG ou encore de la littérature (II et III). Les GDE et signatures vont être annotés grâce à des outils d'annotation comme Ingenuity Pathway Analysis (IPA), ou l'interface cytoscape ou encore via David Database (IV), une fois les données annotés nous espérons trouver des molécules cibles (V), qui peuvent être validés par des méthodes réductionnistes comme les souris KO ou des tumeurs siRNA pour les molécules cibles (VI). La stratégie peut être appliquée à nouveau avec les souris Ko et/ou les tumeurs invalidées (VII).

### III. RESULTATS

La partie RESULTATS sera composée de 3 chapitres :

#### **Article 1: en préparation**

##### **Systems immunology study of tumor microenvironment reveals an early immunological storm induced by tumor cells and identify potential therapeutic targets**

Djamel Nehar-Belaid, Tristan Courau, Nicolas Dérian, Wassila Carpentier, Béatrice Bault, Adrien Six, David Klatzmann

*Immunology-Immunopathology-Immunotherapy research unit*

*University Pierre & Marie Curie, CNRS UMR7211 & INSERM U959, Hôpital Pitié-Salpêtrière, PARIS*

#### **Article 2: en préparation**

##### **Synergistic effects of VEGF and TGFbeta knock down on tumor microenvironment dramatically improves tumor sensitivity to immune responses and immunomodulators**

Tristan Courau\*, Djamel Nehar-Belaid\*, Nicolas Dérian, Béatrice Bault, Adrien Six, David Klatzmann

*Immunology-Immunopathology-Immunotherapy research unit*

*University Pierre & Marie Curie, CNRS UMR7211 & INSERM U959, Hôpital Pitié-Salpêtrière, PARIS*

Le chapitre III fait l'objet d'un autre article qui va être soumis très prochainement (avant la date exigée par l'école doctorale).

#### **Article 3: soumis pour publication**

##### **The immunotolerant microenvironments of pregnancy and cancer are similar and orchestrated by regulatory T cells**

Djamel Nehar-Belaid <sup>a, b, c</sup>, Tristan Courau <sup>a, b, c</sup>, Nicolas Dérian <sup>a, b, c</sup>, Laura Florez <sup>a, b, c</sup>, Maria-Grazia Ruocco <sup>a, b, c</sup> and David Klatzmann <sup>a, b, c, d</sup>

a Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, I3, F-75013, Paris, France

b INSERM, UMR\_S 959, F-75013, Paris, France

c CNRS, FRE3632, F-75013, Paris, France

d AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Department of Biotherapies and the Clinical Investigation Center in Biotherapy, F-75013, Paris, France

Corresponding author: david.klatzmann@upmc.fr

## **Chapitre I. Etude du Microenvironnement tumoral**

Afin de comprendre les mécanismes responsables de la grande complexité caractéristique du microenvironnement tumoral, nous nous sommes intéressés à l'étude de deux modèles tumoraux distincts, un modèle fortement immunogène, les cellules AB1 (modèle de mésothéliome (Davis et al., 1992) et un modèle faiblement immunogène, les cellules B16 (modèle de mélanome ).

Je présenterai dans un premier temps les travaux et résultats obtenus lors de l'étude du modèle B16. Pour ce modèle, nous nous sommes intéressés au microenvironnement tumoral à un temps précoce (4 jours) et à un temps relativement tardif (14 jours) après l'injection de la tumeur.

Dans un second temps, je présenterai les résultats obtenus avec le modèle AB1. Concernant ce modèle, nous nous sommes intéressés au microenvironnement ainsi qu'aux ganglions drainants la tumeur et ceci 2, 4 et 14 jours après injection de la tumeur.

## **I. Modèle B16-WT**

Dans un premier temps nous avons analysé le microenvironnement des cellules tumorales (B16/F10) non modifiées qu'on appellera : B16-WT. Par la suite nous utiliserons d'autres types de cellules B16, les B16 invalidées pour certaines molécules.

### **1. Protocole expérimental**

$10^5$  de cellules tumorales B16/F10 ont été injectées en sous-cutané au niveau du flanc de 6 souris C57Bl/6. Quatre et quatorze jours après l'injection des cellules tumorales, les ganglions (drainants et non drainants), les sites tumoraux et un prélèvement de peau loin du site tumoral (comme contrôle) sont prélevés. Les cellules issues des différents organes ont été lysées puis congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans le tampon RLT plus (QIAGEN). Les échantillons de peaux dans ont été stockés dans du trizol pour être broyés et homogénéisés ultérieurement (TissuLyser, QIAGEN). L'extraction des ARNs totaux est ensuite réalisée en suivant le protocole fourni dans le kit « RNeasy plus mini » (QIAGEN). La concentration en ARN est mesurée grâce au Nanodrop. L'ARN pouvant être dégradé lors de l'extraction, il a été nécessaire de réaliser un contrôle de leur qualité en utilisant le Bioanalyseur *Agilent*, seuls les ARNs ayant un RIN (RNA Integrity Number) supérieur à 7 ont été utilisés. Les différentes étapes de préparation de l'ARN résumées ici sont le fruit de mises au point réalisées par mes soins dans le but d'obtenir des ARN de très bonne qualité avec un rendement acceptable. L'étude du transcriptome est basée sur l'utilisation de la technologie Illumina (puces MouseWG-6 v2.0). Le groupe contrôle est composé d'échantillons de peaux sans cellules tumorales.

Etant intéressés par en priorité par le microenvironnement tumoral, concernant ce modèle, l'étude transcriptomique a porté uniquement sur l'étude du microenvironnement tumoral.

Nous avons appliqué la stratégie décrite dans (STRATEGIE D'ANALYSE), à savoir la sélection et l'analyse des GDE dans un premier temps puis la génération et l'analyse des signatures moléculaires dans un second temps.

### **2. Analyse des jeux de données**

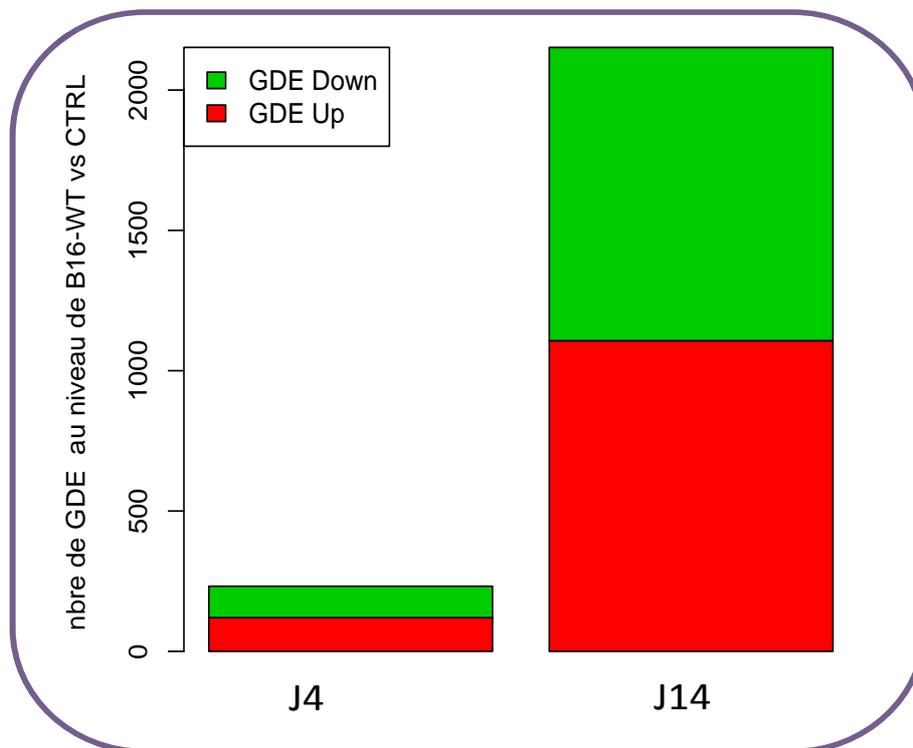
Dans une volonté de clarté et devant le nombre de jeux de données analysés, nous avons décidé de garder la même structure pour présenter les résultats obtenus pour chacun des jeux générés. Nous commencerons par analyser des GDE (entre la condition d'intérêt : ici microenvironnement tumoral à J4 ou J14 et la condition contrôle), d'abord par une analyse descriptive (nombre de gènes sous forme d'histogrammes), puis par leur annotation (Heatmap, études de fonctions ou voies immunologiques). Ensuite, l'analyse des signatures sera composée de leur analyse descriptive, la génération de réseaux de modules fonctionnels

(analyse, comparaisons..) et des études d'enrichissement (tableaux). Pour finir, seront présentées quelques expérimentations permettant de valider ces résultats.

### 3. GDE au niveau du microenvironnement tumoral

#### a. Analyse descriptive

Les GDE (entre la condition d'intérêt : ici microenvironnement B16-WT à J4 ou à J14 et la condition contrôle) ont été triés en fonction de la valeur statistique (p-value, corrigée), la Figure 19 décrit le nombre de GDE up-régulés (en rouge) et down-régulés (en vert) générés dans chaque condition. On constate que 4 jours après l'injection de cellules tumorales (J4), le nombre de GDE au niveau du microenvironnement tumoral est de 232 gènes (120 up-régulés et 112 down régulés) alors que 14 jours après l'injection (J14), le nombre des GDE est de 2152 gènes (1107 surexprimées (ou up régulés) et 1045 sous-exprimées (ou down régulés)). On observe d'une part que qu'il y 9,28 fois plus de GDE à J14 par rapport à J4 cette (le nombre total des sondes détectées à J4 et J14 au niveau de la puce étant identique). D'autre part, on constate qu'il y a sensiblement le même nombre de GDE UP- et Down-régulés dans chaque condition.



**Figure 19. GDE à J4 et J14 au niveau du microenvironnement.**

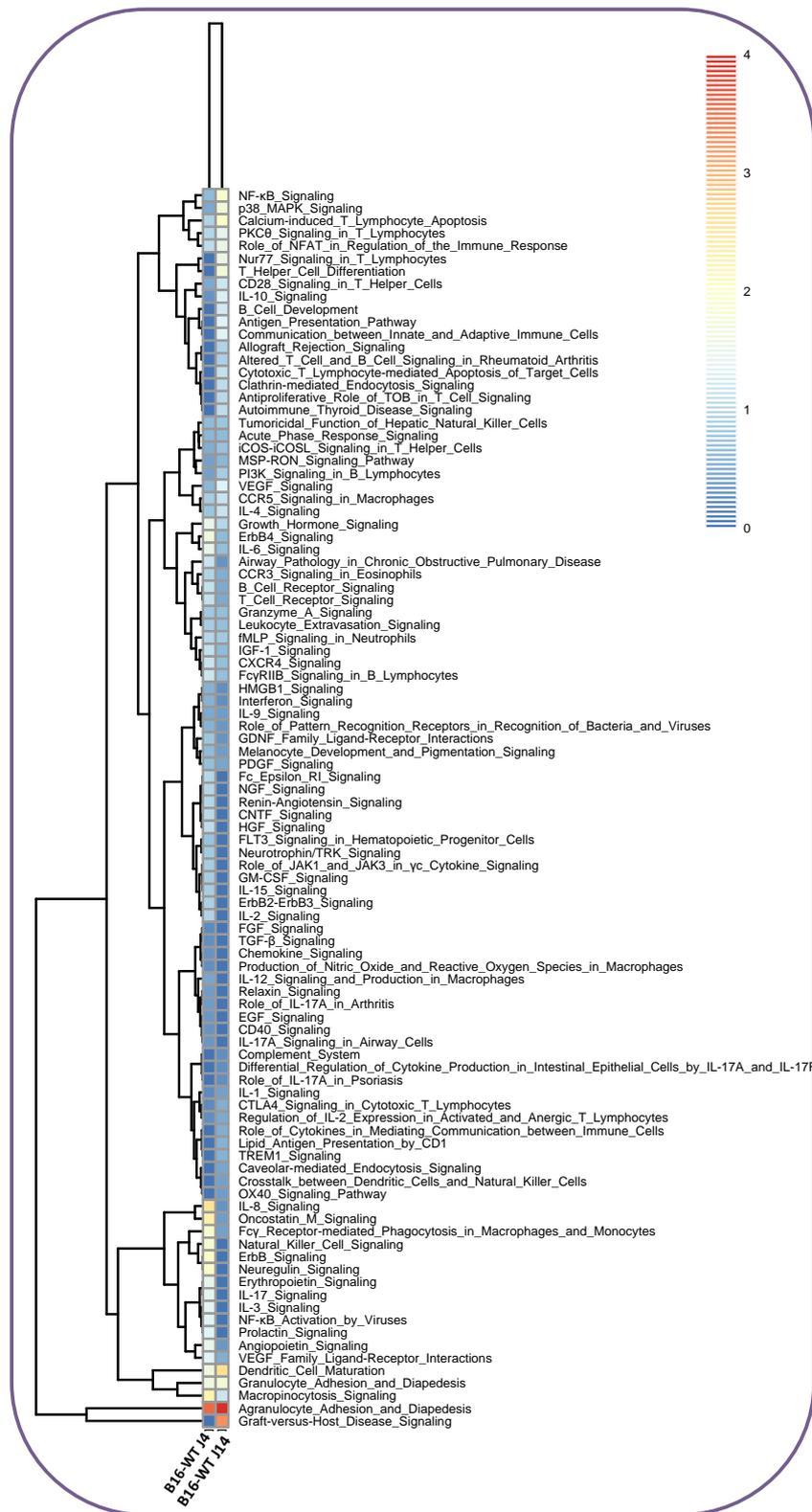
Le nombre de GDE statistiquement significatifs (p-value < 0,05) générés est représenté pour chaque condition (CTRL vs B16-J4 et CTRL vs B16-J14). En rouge, les GDE up-régulés et en vert les GDE down régulés.

## **b. Annotation fonctionnelle**

Les GDE générés à partir de chaque comparaison (CTRL vs J4 et CTRL vs J14) ont été par la suite annotés au moyen de IPA (Ingenuity Pathway Analysis). Cet outil permet de mettre en évidence les voies de signalisation enrichies au sein de la liste des GDE et de les classer de la plus significativement enrichies (forte p-value corrigée) à la moins enrichies (faible p-value corrigée). Il renseigne aussi sur l'état d'activation de chaque gène composant la voie de signalisation et par conséquent sur l'état d'activation de la voie.

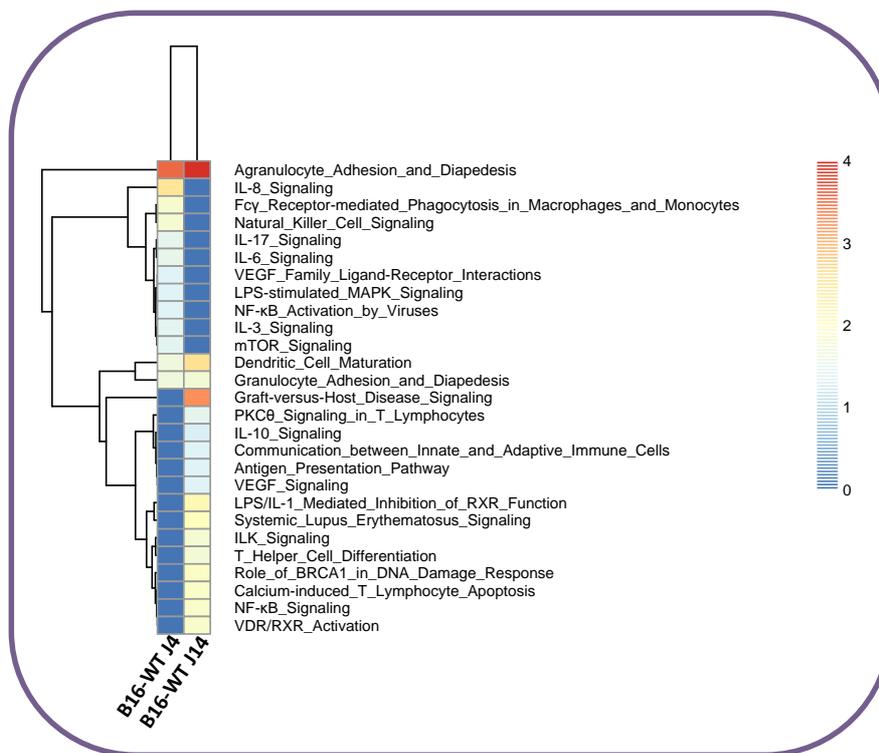
Afin de faciliter l'analyse et d'avoir une vision globale des voies qui sont enrichies dans chaque condition, nous avons extrait les fichiers d'enrichissement des voies de signalisation à partir d'IPA et nous avons produit des heatmap représentant ces voies (en fonction de la valeur statistiques attribuée, IPA utilise le  $-\log(p\text{-value, corrigé})$ ).

Les voies de signalisation immunologiques enrichies significativement dans au moins une comparaison à savoir CTRL vs B16-J4 et/ou CTRL vs B16-J14 sont représentées dans la Figure 20. Cette figure met en évidence une mobilisation de nombreuses voies de signalisation immunologiques au niveau du microenvironnement tumoral à J4 qui s'accroît à J14. Par la suite nous avons représenté uniquement les voies de signalisation significativement enrichies ( $p\text{-value corrigée} < 0,05$ ) dans Figure 21. On constate que les voies impliquées dans la réponse immunitaire à jour 4 sont différentes de celles mises en place à jour 14. Ainsi, à jour 4, on observe une modulation des voies de signalisation de plusieurs cytokines telle que IL3, IL6, IL8 et l'IL17, ainsi que les voies de signalisation concernant les cellules NK, macrophage et la maturation des cellules dendritiques. A jour 14, de nombreuses voies concernant la présentation antigénique et maturation des cellules dendritiques, et les cellules T sont modulées. On observe aussi une modulation de la voie du VEGF, de l'IL10 et du NF $\kappa$ B. Par la suite, afin de déterminer si les voies de signalisation significativement enrichies sont activées (up-régulées) ou inhibées (down-régulées), nous avons analysé toutes les voies immunologiques significativement enrichies mais pour alléger la figure nous avons représenté que les 10 premières voies immunologiques pour chacune des comparaisons (CTRL vs J4 et CTRL vs J14) Figure 22. On constate que les voies de signalisation représentées sont globalement down-régulées. En effet, à jour 4, on observe une down-régulation de la maturation des cellules dendritiques, des voies de signalisation concernant les cellules NK et granulocytes. On observe aussi un up régulation des voies d'IL8 et de la neuroréguline. A jour 14, la down-régulation des voies immunologiques est plus marquée car on observe une down-régulation de nombreuses voies concernant la présentation antigénique, la maturation des cellules dendritiques, des interférons et des cellules T.



**Figure 20. Ensemble des voies de signalisation immunologiques modulées au niveau du microenvironnement tumoral B16-WT à J4 et J14.**

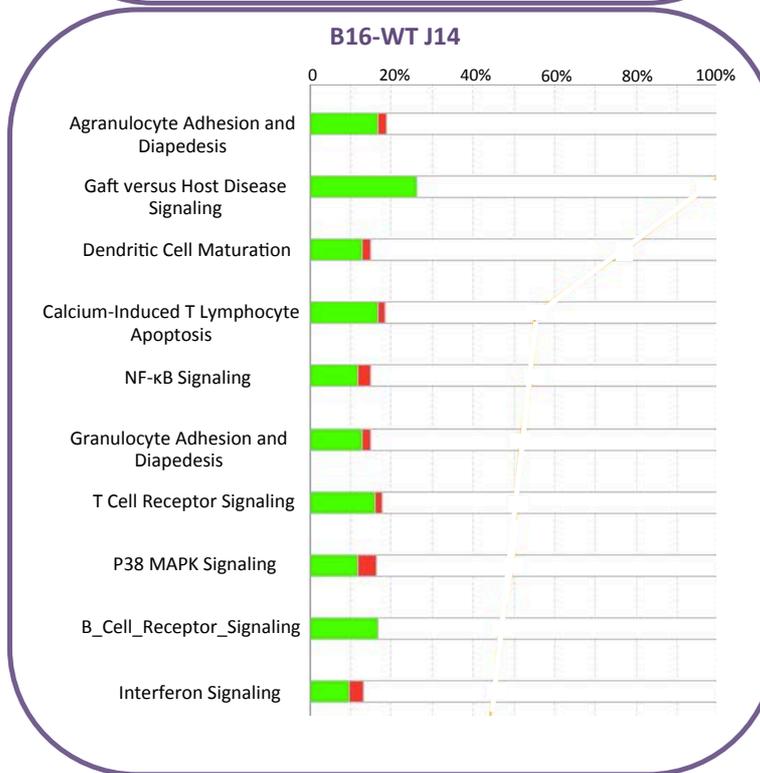
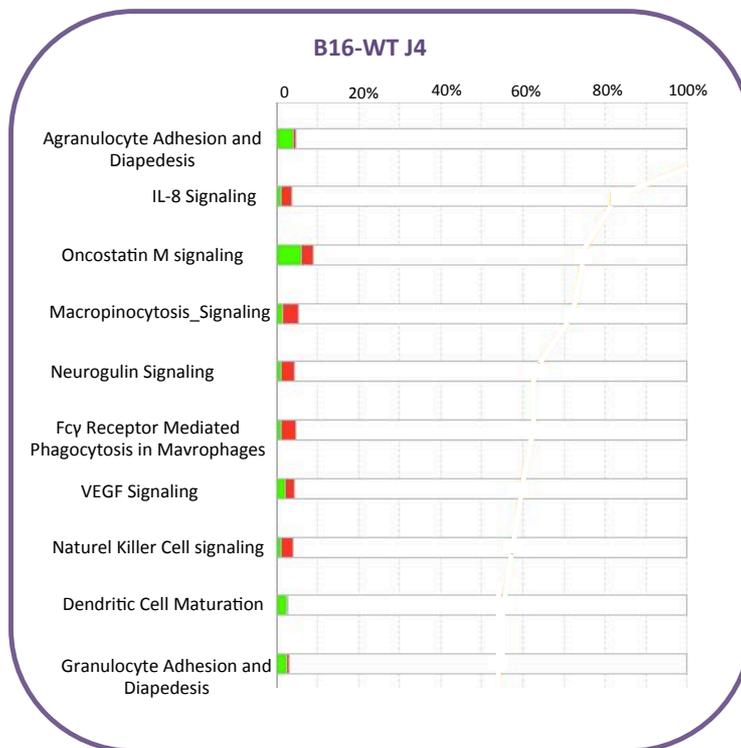
Sont représentées toutes les voies de signalisation immunologiques enrichies (significativement ou pas) parmi les GDE à J4 et J14 au niveau du microenvironnement tumoral en comparaison au groupe CTRL. Le heatmap a été produit en fonction des valeurs statistiques ( $-\log(p\text{-value})$ ) attribuées à chaque voie de signalisation enrichie : code couleur en à droite. Les voies sont classées par significativité : Bleu foncé = voie peu significative, rouge = très significative.



**Figure 21. Ensemble des voies de signalisation immunologiques significativement modulées au niveau du microenvironnement tumoral B16-WT à J4 et J14.**

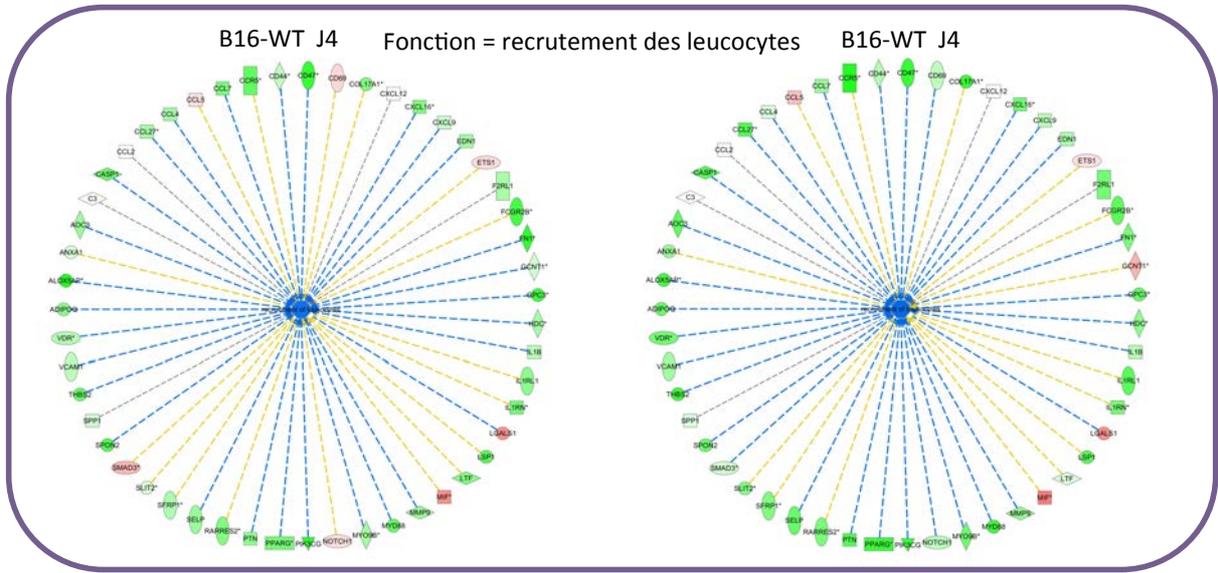
Sont représentées uniquement les voies de signalisation immunologiques enrichies (significativement ou pas) parmi les GDE à J4 et J14 au niveau du microenvironnement tumoral en comparaison au groupe CTRL. Le heatmap a été produit en fonction des valeurs statistiques ( $-\log(p\text{-value})$ ) attribuées à chaque voie de signalisation enrichie. Les voies sont classées par significativité : Bleu foncé = voie peu significative, rouge = très significative.

IPA offre la possibilité de comparer une fonction immunologique donnée entre différentes conditions. La modulation d'expression des gènes est représentée par un code couleur (up = rouge et down = vert) déduits à partir de la valeur de la statistique du test utilisé (t-test). Dans la Figure 23, nous avons comparé pour chaque condition l'état de modulation de gènes faisant partie d'une fonction immunologique nommée « recrutement des leucocytes ». Les gènes composants cette fonction sont globalement down-régulés, ce qui a pour conséquence une prédiction de son inhibition. De plus, nous avons obtenus des résultats similaires pour plusieurs fonctions immunologiques T, B et autres (voir Figure 31). Parmi celles-ci, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation de l'interféron- $\gamma$ , une voie essentielle dans l'immunité anti-tumorale (Figure 24). La majorité des gènes appartenant à cette voie sont down-régulés tels que Jak1, Jak2, Pias1, IFTIM, IRF9, STAT1 (à J14). D'autres gènes sont quant à eux up-régulés comme la chaîne beta du récepteur de l'interféron- $\gamma$ .



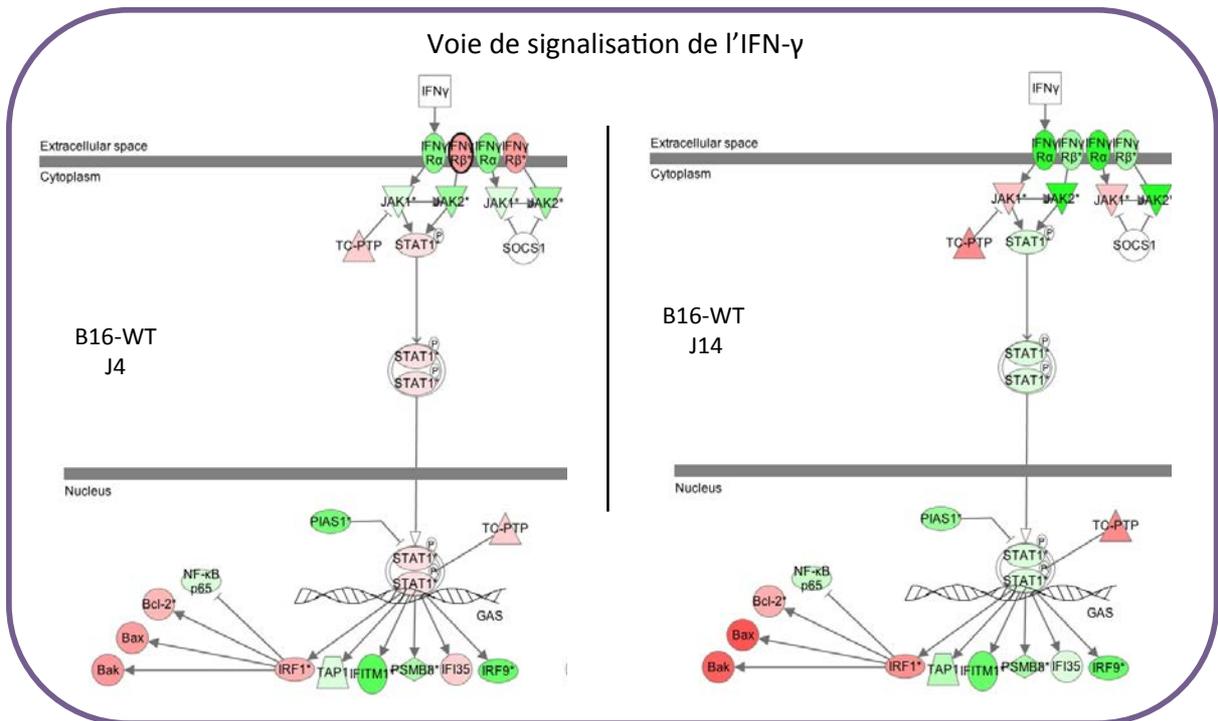
**Figure 22. Etat de modulation des 10 premières voies immunologiques significativement enrichies au niveau des GDE à J4 et J14.**

Les dix premières voies de signalisation immunologiques significativement enrichies (p-value corrigée < 0,05) au sein des GDE à J4 et à J14 sont représentées. Le nom de chaque voie de signalisation est représenté à gauche. Chaque voie étant composée d'un certain nombre de gènes, le pourcentage d'enrichissement des GDE pour chacune des voies est indiqué à gauche (% = nombre de gènes de la voie présent dans les GDE/ le nombre total de gènes composant la voie). En vert, les gènes qui sont down régulés et en rouge les gènes up-régulés



**Figure 23. Etat de modulation d'une fonction immunologique en fonction de la valeur statistique des GDE (à J4 et J14) qui la compose.**

Les GDE ont été annotés au moyen de IPA (Ingenuity Pathway Analysis), la fonction « recrutement des leucocytes » a été sélectionnée (au milieu du cercle) et l'état de modulation des gènes associés à cette fonction a été représenté (les gènes en vert = gènes down-régulés, gènes en rouge = gènes up-régulés), quand la fonction est bleue cela veut dire qu'elle est inhibée (elle est orange en cas d'activation).



**Figure 24. Etat de modulation de la voie de signalisation de l'interféron- $\gamma$  en fonction de la valeur statistique des GDE au niveau du microenvironnement tumoral à J4 et J14.**

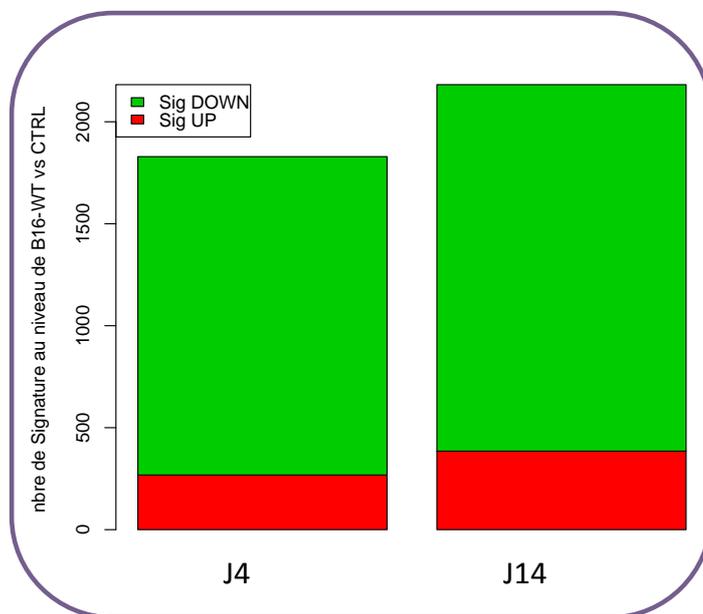
La voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$  est représentée à J4 et J14. En vert, les gènes qui sont down régulés et en rouge les gènes up-régulés.

#### 4. Les signatures moléculaires

Avant d'aborder l'analyse des signatures moléculaires, pour chaque jeu de données produit, nous allons analyser deux types de signatures moléculaires : (i) une liste contenant des signatures issues de ICA → GSEA qui s'appellent ND + numéro du projet XXX, NDXXX (ND036 = jeu de donnée numéro 36), ce sont les signatures spécifique du jeu et extraites par ICA (ii) une liste de signatures issues des bases de données ou et de la littérature, elles portent généralement le nom du processus biologique qu'elles décrivent ou le nom de la personne qui les a générée, ces signatures sont utiles et très informatives car elle sont bien définies et validées. Les enseignements et conclusions extraits à partir des signatures moléculaires sont évidemment la résultante d'une analyse complémentaire de ces deux types de signatures.

##### a. Analyse descriptive

La figure 25 décrit le nombre de signatures moléculaires statistiquement enrichies à la sortie de GSEA. On constate qu'à jour 4 après l'injection de cellules tumorales (J4), le nombre de signatures est de 1829 signatures au niveau du microenvironnement B16-WT (268 up-régulées et 1561 down régulées). Contrairement aux GDE on observe un déséquilibre entre les signatures UP- et Down-régulées dans chaque condition (en faveur des signature Down) et en comparant le nombre de signatures à entre les jours, on constate une légère augmentation à J14.



**Figure 25. Signatures moléculaires à J4 et J14 au niveau du microenvironnement tumoral.**

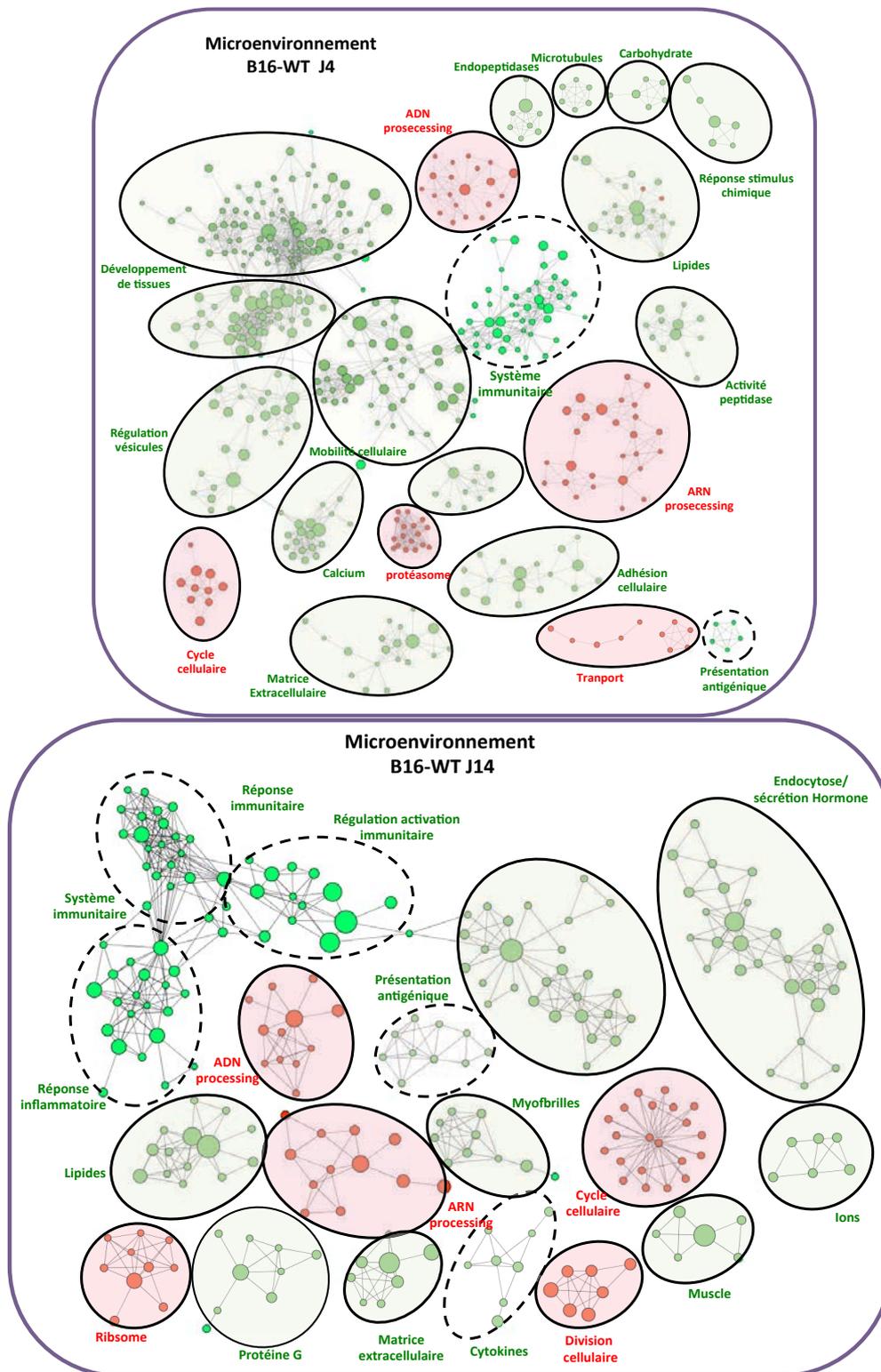
Le nombre de signatures statistiquement significatives ( $p$ -value < 0,05) générés est représenté. En rouge, les signatures up-régulées et en vert les signatures down régulées.

## **b. Réseau de modules fonctionnels de signatures**

Les signatures moléculaires statistiquement enrichies à la sortie de GSEA ont été analysées de manière globale en utilisant le plugin « enrichment map » du logiciel Cytoscape (comme décrit dans la partie méthodologie). Cet outil permet la visualisation de l'enrichissement fonctionnel des signatures moléculaires significatives pour chaque comparaison (CTRL vs J4 et CTRL vs J14) et la génération de modules de signatures sur la base de leur similarité. Chaque module représente un mécanisme biologique donné annoté manuellement à partir des signatures le constituant. Le réseau de modules fonctionnels ainsi produit renseigne sur l'état de modulation (up ou down) de chaque voie biologique qui y participe. Ainsi, la Figure 26 montre au niveau du microenvironnement tumoral, aussi bien à J4 qu'à J14, une up-régulation des modules associés à la synthèse d'ADN, le transport d'ARN ainsi que le métabolisme. On observe que les modules immunologiques (système immunitaire, présentation antigénique, cytokines) sont down régulés. Les modules associés à la matrice extracellulaire et processus vésiculaires (endocytose..) sont également down-régulés.

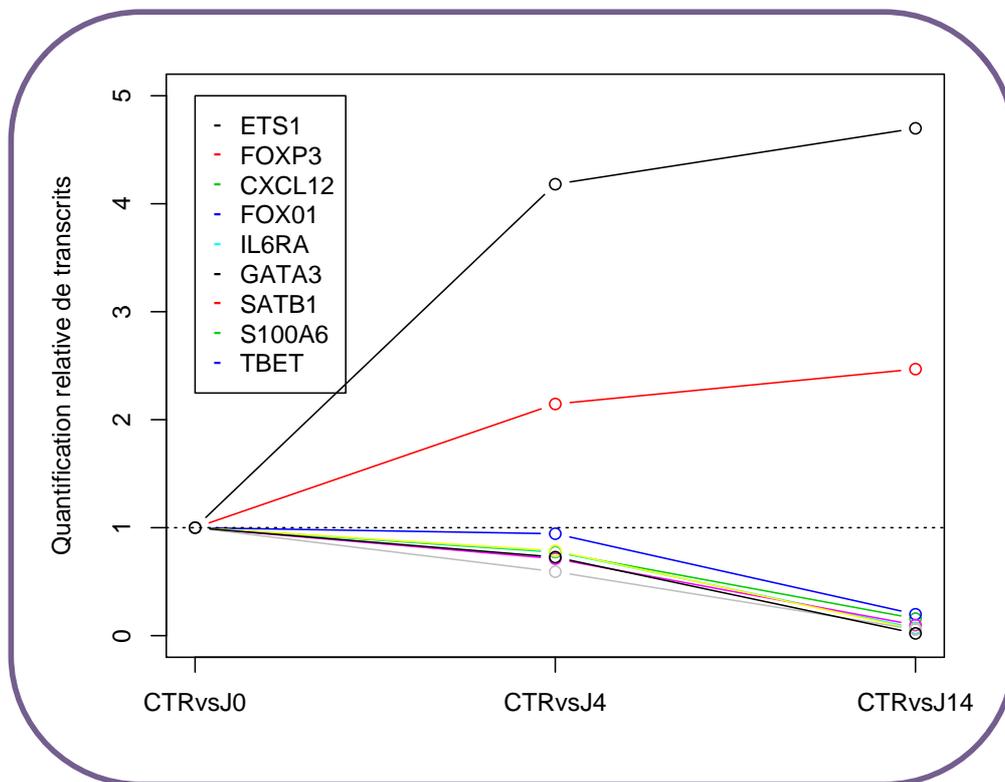
## **5. PCR quantitative**

Pour des raisons techniques et financières nous n'avons pas pu tester tous les gènes appartenant aux voies de signalisation immunologiques significativement enrichies dans le microenvironnement B16-WT. Néanmoins, un certains nombres de gènes a pu être validé par PCR quantitative. Nous avons sélectionné des gènes appartenant à différentes voies de différenciation (Th1, Th2 et Tregs). La Figure 27 décrit une down-régulation des gènes Th1 tels que T-bet, IL6RA et Th2 (GATA3) et une up-régulation des gènes régulateurs tels que Foxp3 et ETS1. Cette modulation (Up et Down) est présente à J4 et s'accroît à J14. De manière intéressante, nous constatons une down-régulation du gène SATB1 or la répression de ce gène est requise pour la fonction suppressive des cellules T régulatrices ainsi que pour l'inhibition de la différenciation des cellules effectrices (Beyer et al., 2011).



**Figure 26. Réseau de modules fonctionnels de signatures moléculaires représentant le microenvironnement tumoral « B16 » à J4 et J14.**

Les signatures (générées par ICA et issues de la littérature) sélectionnées par GSEA sont représentées. Chaque signature est représentée par un nœud et un ensemble de nœuds appartenant à la même voie biologique est regroupé en modules. La taille des nœuds reflète le nombre de gènes qui composent les signatures et l'épaisseur des traits entre les nœuds leur similarité. Les modules immunologiques sont représentés en pointillé. Un indice de similarité (entre les nœuds du même module) de 90% a été sélectionné avec une p-value corrigée  $=5 \cdot 10^{-4}$



**Figure 27. Quantification relative par PCR quantitative des transcrits issus du microenvironnement B16-WT.**

L'expression de différents transcrits a été quantifiée par reverse PCR quantitative (RT-PCR) à partir des ARN qui nous ont permis de produire les données transcriptomiques dans 3 conditions (la condition contrôle « CTRLvsJ0 », c'est la condition de référence, la condition B16-WT à jour 4 « CTRLvsJ4 », la condition B16-WT à jour 14 « CTRLvsJ14 »). Chaque point représente la moyenne de 5 souris.

## 6. Conclusions de l'étude

De l'analyse des GDE et des signatures moléculaires générées à partir de ce jeu de données, il en sort que dans ce modèle de tumeurs B16, des tumeurs faiblement immunogènes, les voies de signalisation immunologiques sont globalement inhibées.

## II. Modèle B16 : WT vs VEGF/TGFβ

En se basant sur nos résultats et sur la littérature, nous avons généré au laboratoire deux sous-types de tumeurs B16, invalidées par shRNA pour deux molécules clés de la réponse immunitaire anti-tumorale.

### 1. Génération des lignées tumorales B16-shVEGF et B16-shTGFβ

Brièvement, les lignées tumorales « invalidées » ont été générées grâce à la technique du shRNA qui permet de cibler l'ARN d'intérêt afin d'en déclencher la dégradation et par conséquent d'en bloquer la traduction. Pour ce faire, les cellules B16-WT ont été transduites (via un vecteur lentiviral) avec les ADN codants les différents shARN. Des clones de « B16-invalidées » ont été générés par dilutions limites puis sélectionnés après vérification de la quantité d'ARNm par PCR quantitative.

La première lignée est invalidée pour le gène TGFβ (B16-shTGFβ), la deuxième est invalidée pour le VEGF (B16-shVEGF). En résumé nous avons donc à disposition trois lignées de tumeurs B16 :

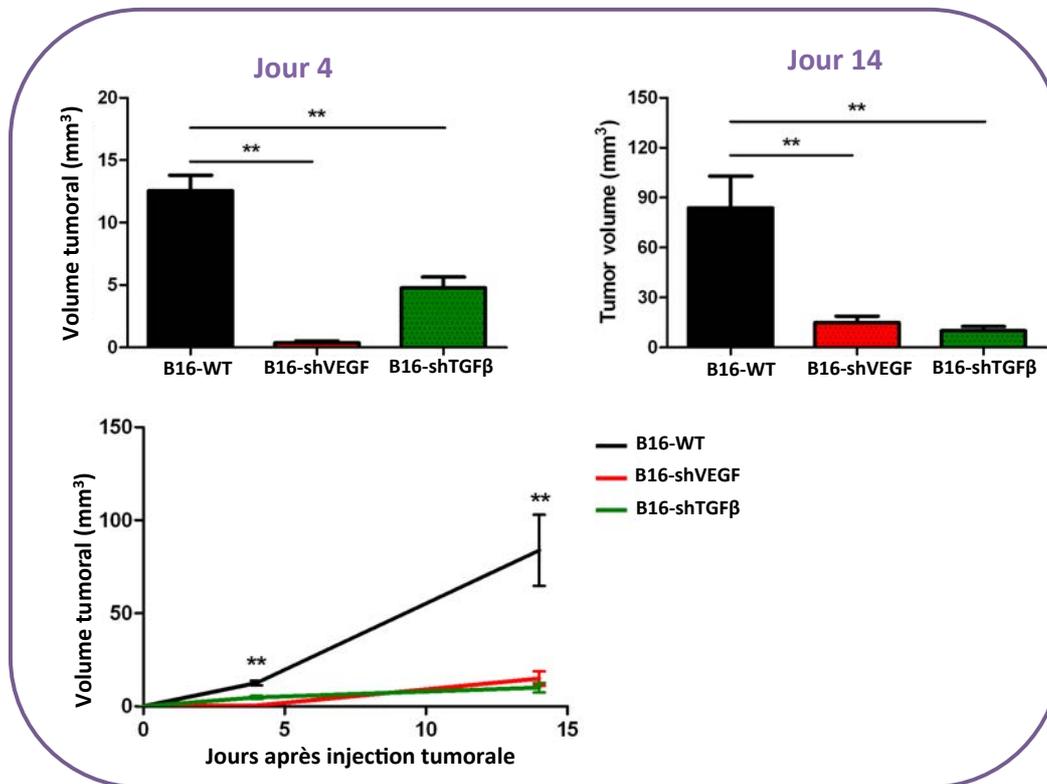
- 1- les tumeurs sauvages (non modifiées), qu'on appellera : **B16-WT**
- 2- les tumeurs invalidées pour le TGFβ, qu'on appellera : **B16-shTGFβ**
- 3- les tumeurs invalidées pour le VEGF, qu'on appellera : **B16-shVEGF**

*In vitro*, les trois lignées tumorales utilisées (B16-WT, B16-shTGFβ, B16-shVEGF), ont des cinétiques de croissance -mesurées par le temps de doublement- identiques.

Par soucis de clarté, dans cette partie les résultats de B16-WT ne seront pas ré-analysés, ils seront parfois inclus dans des comparaisons avec les B16-shTGFβ et B16-shVEGF.

### 2. Croissance tumorale des différentes tumeurs

Les trois lignées tumorales ( $10^5$  cellules) ont été injectées en intra-cutané, au niveau du flanc et la croissance tumorale des trois lignées de tumeurs (WT, TGF et VEGF) a été mesurée à J4 et à J14. La Figure 28 montre qu'à J4 et J14 nous observons un retard significatif de la croissance tumoral *in vivo*.



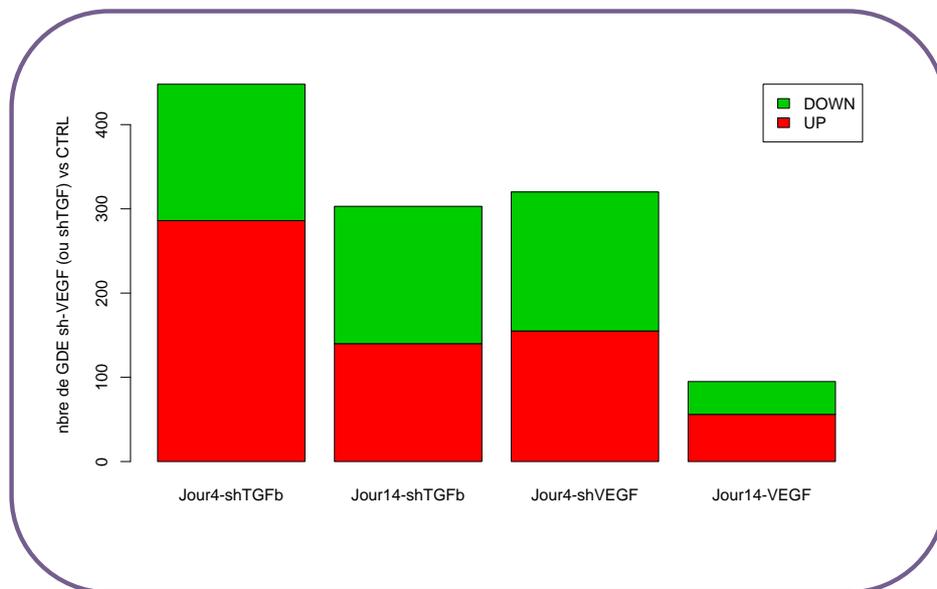
**Figure 28. Croissance tumorale mesurée à Jour 4 et Jour 14 après l'injection de cellules tumorales.**

Chaque histogramme représente la moyenne sur 6 souris. Le volume tumorale (V) est calculé selon la formule :  $V = (L * l^2) / 2$ . L étant la longueur de la tumeur et l la largeur. Cette expérience est représentative d'au moins 5 expériences indépendantes.

### 3. GDE au niveau microenvironnement tumoral

#### a. Analyse descriptive

Comme précédemment, les GDE ont été triés en fonction de leur valeur statistique (p-value corrigée), la Figure 29 résume le nombre de GDE up-régulés (en rouge) et down-régulés (en vert) dans chaque condition. A jour 4 après l'injection de cellules tumorales (J4), le nombre de GDE est de 448 gènes au niveau du microenvironnement B16-TGFβ (286 up-régulés et 162 down régulés) et 320 gènes au niveau du microenvironnement B16-VEGF (155 up-régulés et 165 down régulés). A jour 14 (J14) le nombre des GDE est de 303 gènes au niveau du microenvironnement B16-TGFβ (140 up-régulés et 163 down régulés) et 95 gènes au niveau du microenvironnement B16-VEGF (56 up-régulés et 39 down régulés). On observe donc globalement le même nombre de GDE UP- et Down-régulés dans chaque condition et le nombre de GDE n'est pas statistiquement différents entre (shTGFβ J4, shTGFβ J14, et shVEGF à J4) diminue de 3,4 fois pour les tumeurs shTGFβ. Cependant, dans la condition shVEGF à J14 on observe une diminution significative du nombre de GDE par rapport aux autres conditions.



**Figure 29. Analyse descriptive des GDE issus des comparaisons (CTRL vs B16- shVEGF ou -shTGF) à J4 et à J14.**

Le nombre de signatures statistiquement significatives ( $p$ -value < 0,05) générés est représenté. En rouge, les gènes up-régulés et en vert les gènes down régulés

### **b. Annotation fonctionnelle**

De la même façon que précédemment, les GDE générés à partir de chaque comparaison (CTRL vs B16-WT -shVEGF ou -shTGF) à J4 et J14 ont été annotés et nous avons généré les heatmap correspondants aux voies immunologiques significativement enrichies parmi ces GDE. Cela nous a permis d'avoir une vision globale des enrichissements parmi les GDE au niveau de chaque comparaison Figure 30.

Afin de pouvoir comparer profils d'expression, le microenvironnement B16-WT (décrit précédemment) a été représenté au niveau du heatmap concernant les « sh shTGF $\beta$  » et « shVEGF ». De manière générale et aussi bien à jour 4 qu'à jour 14, on constate que chaque microenvironnement tumoral a un profil d'expression qui lui est propre.

#### Au niveau du microenvironnement « shTGF $\beta$ » :

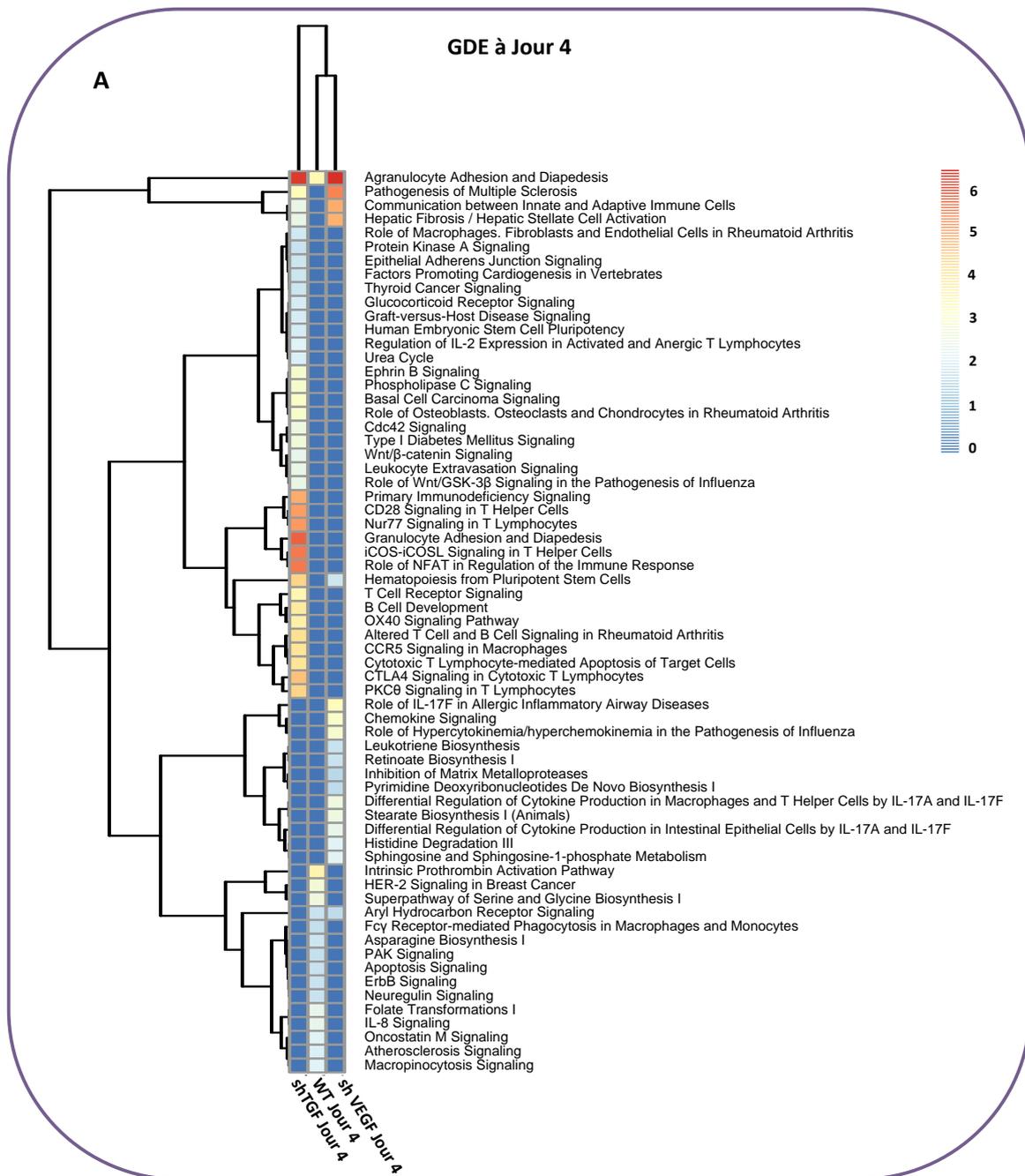
A jour 4, on constate une forte modulation des voies concernant les cellules T, B, ainsi que les voies OX40, CTLA4, ICOS.

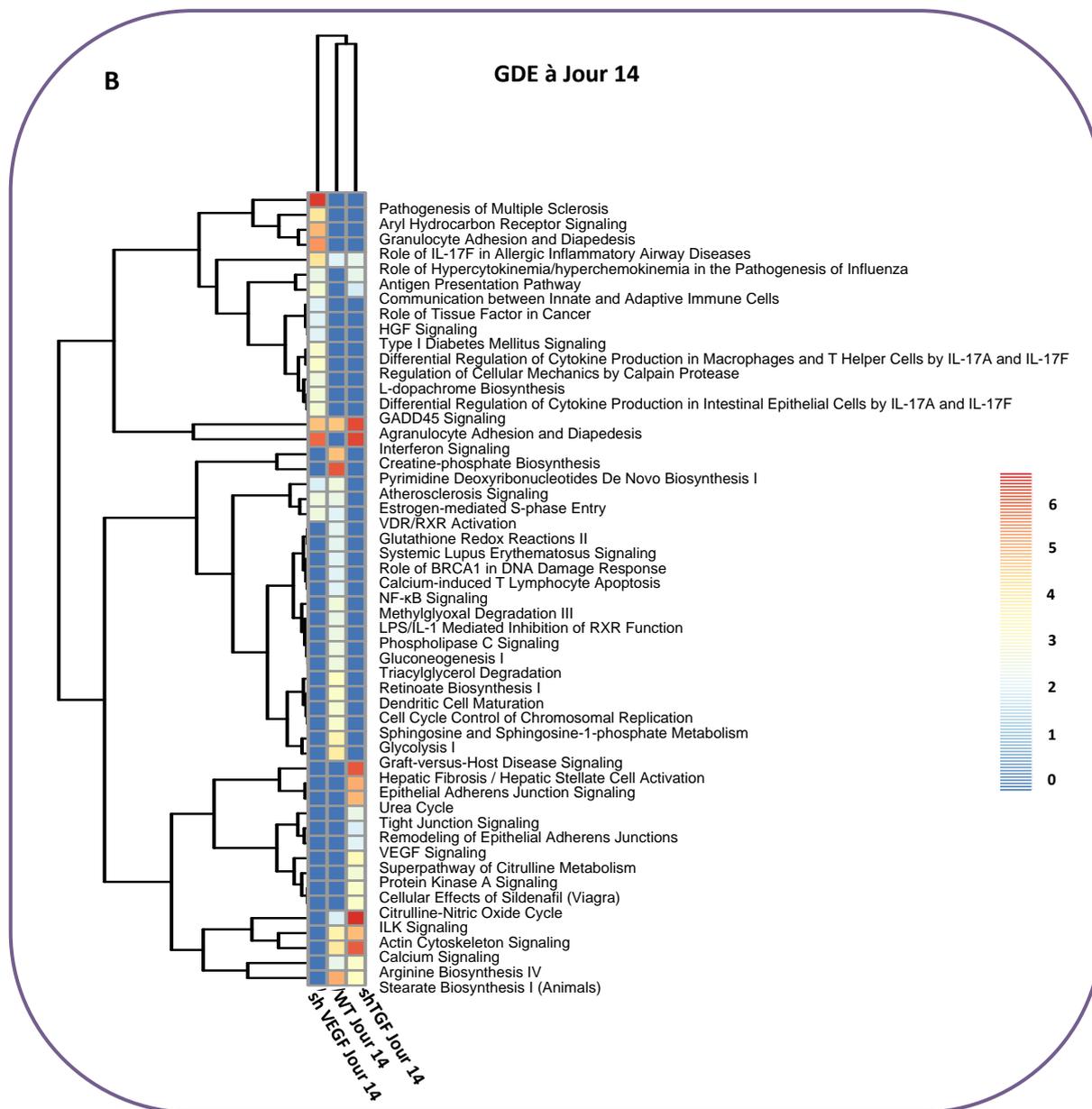
A jour 14, les voies de la présentation antigéniques, des interférons, du VEGF entre autres sont fortement modulées.

#### Au niveau microenvironnement « shVEGF » :

A jour 4, on constate principalement une modulation de voies de l'IL17.

A jour 14, les voies de présentation antigénique, des interférons, communication entre le système immunitaire innée et adaptative sont fortement modulées.





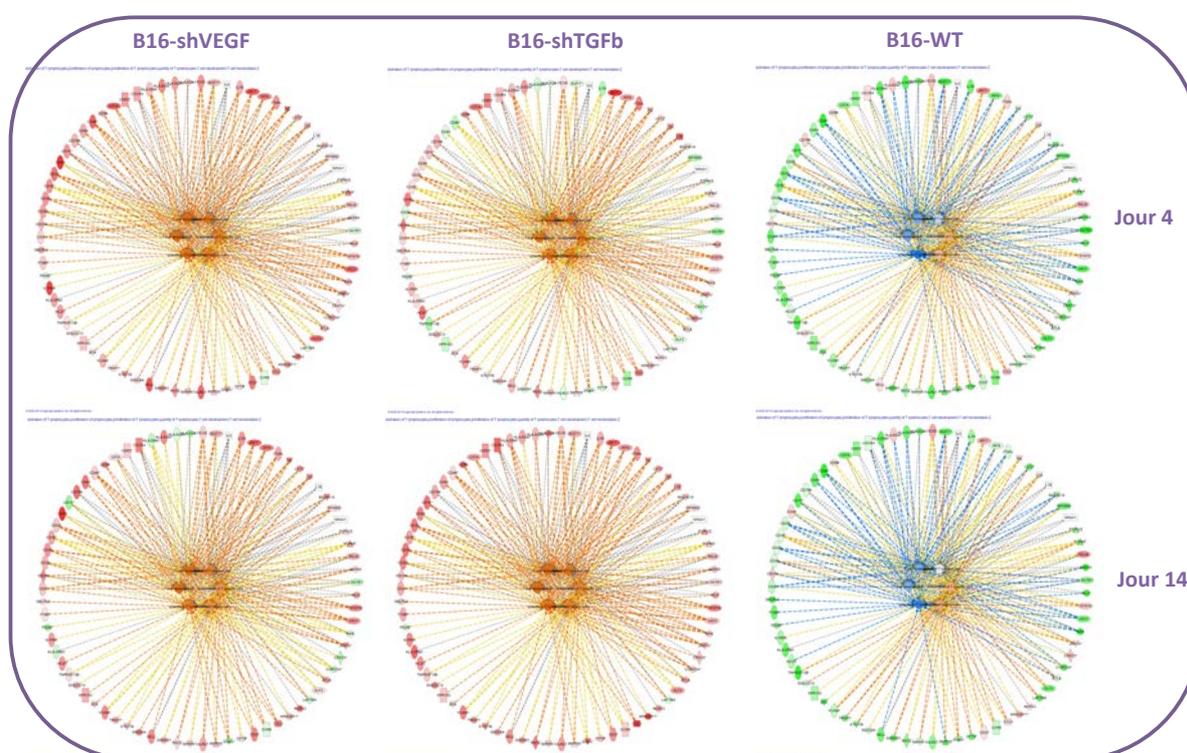
**Figure 30. Ensemble des voies de signalisation immunologiques significativement modulées au niveau du microenvironnement tumoral (B16, shVEGF et shTGF) à J4 et J14.**

Sont représentés uniquement les voies de signalisation immunologiques enrichies au niveau des GDE à J4 (A) et J14 (B) au niveau du microenvironnement tumoral.

Les voies de signalisation sont représentées par la valeur du  $-\log$  (p-value corrigée). Chaque voie est significative dans au moins une condition.

Par la suite nous avons sélectionné six fonctions d'intérêt en relation avec les cellules T comme « *développements de cellules T* », « *production des cellules T* », « *homéostasie des cellules T* », « *qualité de lymphocytes T* », « *quantité de lymphocytes T* » et « *activation des lymphocytes T* ». Ces fonctions ont été comparées entre les différentes conditions en fonction des valeurs statistiques qui reflètent la modulation de l'expression de chaque gène qui compose la fonction.

La Figure 31 montre que les gènes composants ces différentes fonctions sont down-régulés au niveau du microenvironnement B16-WT (aussi bien à jour 4 qu'à jour 14) alors qu'ils sont up-régulés dans les deux autres conditions à savoir les microenvironnements « shVEGF » et « shTGFβ ». C'est ce qu'on appellera le basculement Down → Up.



**Figure 31. Etat de modulation d'une fonction immunologique en fonction de la valeur statistique des GDE (à J4 et J14) qui la composent.**

Les GDE issus de chaque comparaison ont été annotés au moyen de IPA (Ingenuity Pathway Analysis), les fonctions d'intérêt (ici « *développements de cellules T* », « *production des cellules T* », « *homéostasie des cellules T* », « *qualité de lymphocytes T* », « *quantité de lymphocytes T* » et « *activation des lymphocytes T* ») ont été sélectionnées (au milieu du cercle) et l'état de modulation des gènes associés à cette fonction a été représenté. Les gènes en vert = gènes down-régulés, gènes en rouge = gène up-régulés).

La fonction est colorée en bleue lorsqu'elle est inhibée (prédiction) et en orange en cas d'activation (prédiction).

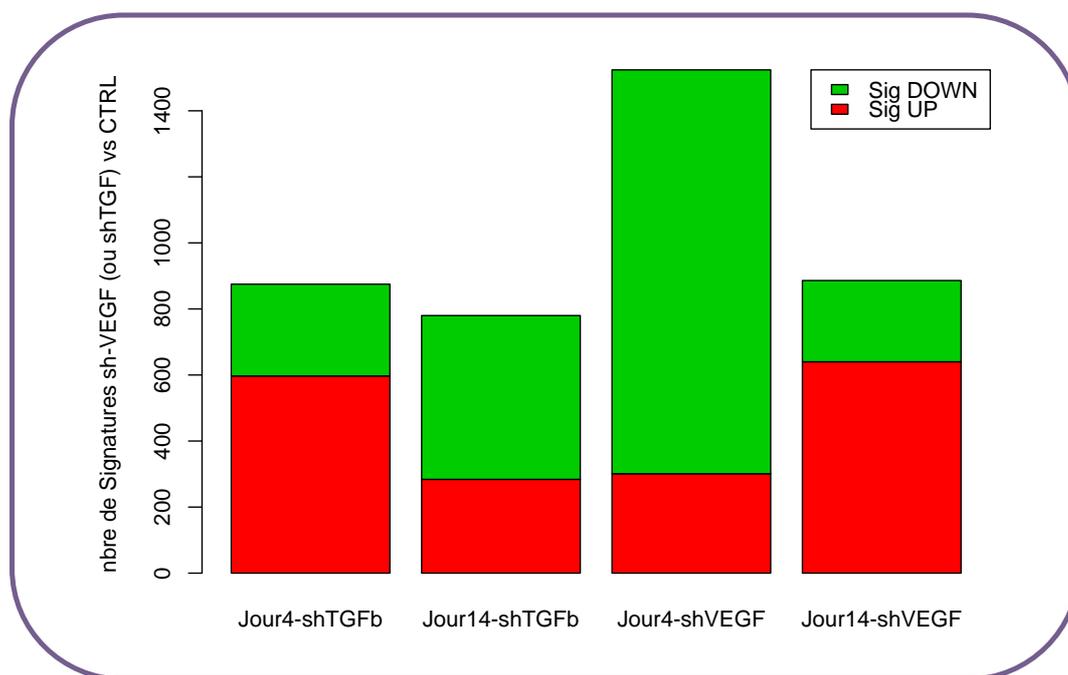
#### 4. Signatures moléculaires

Une fois les GDE analysés, nous nous sommes intéressés aux signatures moléculaires.

##### a. Analyse descriptive

La Figure 32 décrit le nombre de signatures moléculaires statistiquement enrichies à la sortie de GSEA. On constate qu'à jour 4 après l'injection de cellules tumorales (J4), le nombre de signatures est de 875 signatures au niveau du microenvironnement B16-TGF (597 up-régulées et 278 down régulées) et 1424 signatures au niveau du microenvironnement B16-VEGF (301 up-régulées et 1223 down régulées). A jour 14 (J14) le nombre de signatures obtenues est de 780 signatures au niveau du microenvironnement B16-TGF $\beta$  (284 up-régulées et 496 down régulées) et 886 signatures au niveau du microenvironnement B16-VEGF (640 up-régulées et 246 down régulées).

Contrairement aux GDE, on observe globalement un déséquilibre entre les signatures UP- et Down-régulées dans chaque condition (en faveur des signatures Down). De plus on observe 2 à 3 fois plus de signatures dans la condition WT (à J4 et J14, Figure 25) en comparaison avec les deux autres conditions (« B16-shVEGF» et «B16-shTGF $\beta$  »).

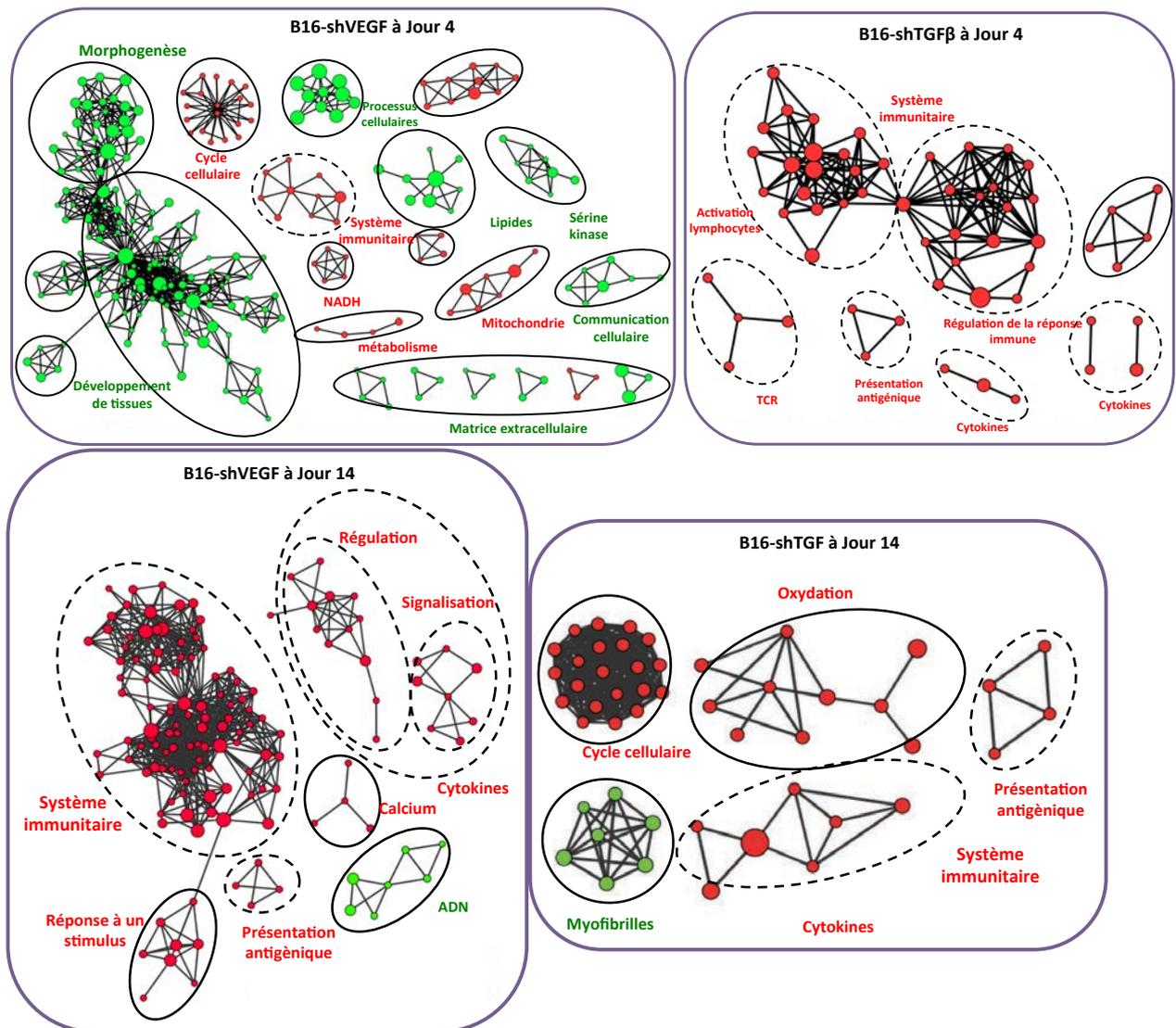


**Figure 32. Analyse descriptive des signatures issues de (B16-shVEGF et B16-shTGF $\beta$ ).**

Le nombre de signatures statistiquement significatives ( $p$ -value < 0,05) générées est représenté. En rouge, les signatures up-régulées et en vert les gènes down régulées.

## b. Réseau de modules fonctionnels

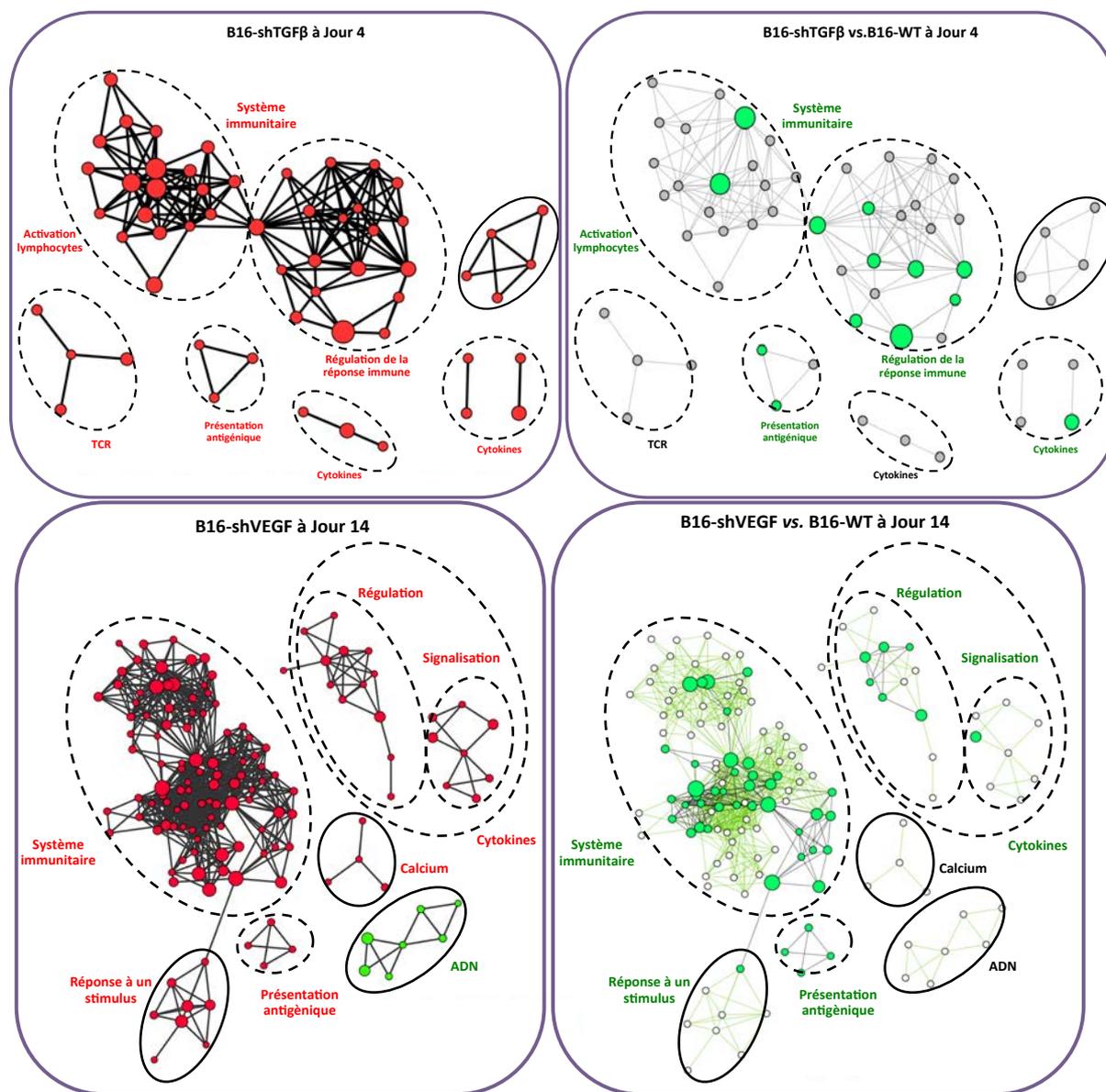
Les signatures moléculaires statistiquement enrichies à la sortie de GSEA ont été analysées de manière globale en utilisant le plugin « enrichment map » du logiciel Cytoscape (comme abordé dans la partie méthodologie). Les réseaux produits à partir des microenvironnements des tumeurs invalidées à J4 et à J14 sont représentés par la Figure 33. On constate, qu'aussi bien à jour 4 qu'à jour 14, dans les deux microenvironnements (« shVEGF » et « shTGF $\beta$  ») les modules fonctionnels immunologiques (système immunitaire, présentation antigénique, ou encore cytokine) sont up-régulés et que cette up-régulation est plus marquée à J14 pour « shVEGF » et à J4 pour « shTGF $\beta$  ».



**Figure 33. Réseaux de modules fonctionnels de signatures moléculaires représentant le microenvironnement tumoral « B16-shVEGF » et « B16-shTGF » à J4 et à J14 après injection de cellules tumorales.**

Les modules ont été générés en regroupant les nœuds participant au même mécanisme biologique. En rouge, les signatures (nœuds) up-régulés et en vert les signatures (nœuds) down-régulés. Les modules immunologiques sont représentés en pointillé

Les réseaux fonctionnels de signatures des microenvironnements B16-shVEGF» et B16-shTGFβ ont été comparés au réseau du microenvironnement tumoral de la tumeur WT en superposant le réseau du microenvironnement des B16-WT à celui des B16-shVEGF ou B16-shTGFβ au même jour. La Figure 34 montre que, sur la superposition B16-WT/B16-shTGFβ à J4, plusieurs nœuds des modules immunologiques basculent d'une up-régulation (réseau B16-shTGFβ) à une down régulation (réseau B16-WT). Cette observation est plus marquée pour la comparaison B16-WT/B16-shVEGF à J14.

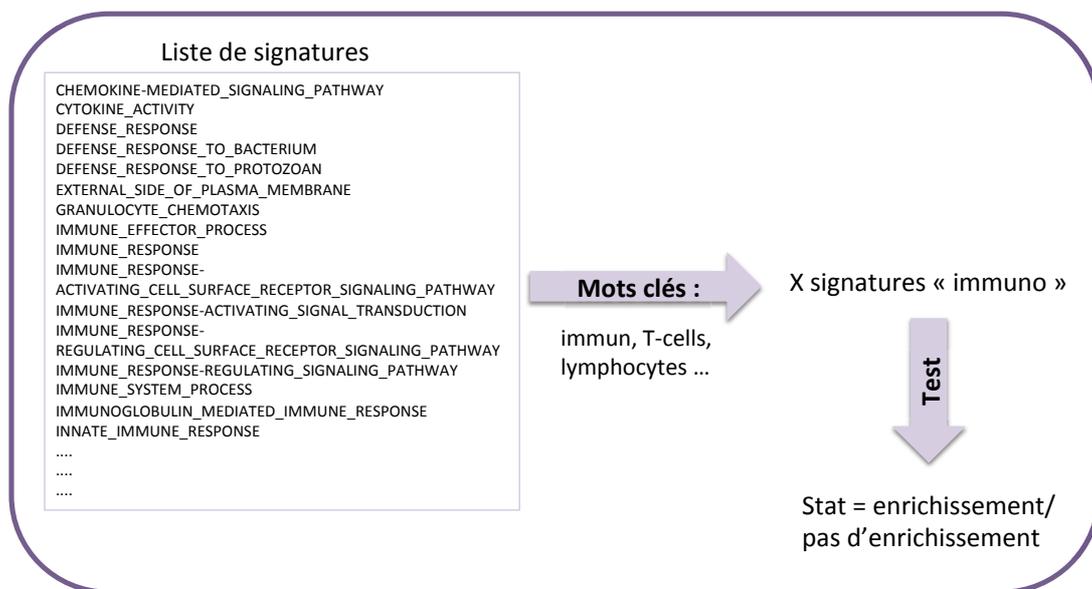


**Figure 34. Comparaison des réseaux fonctionnels du microenvironnement des tumeurs invalidées (« B16-shVEGF » et « B16-shTGFβ ») au réseau des tumeurs sauvages (B16-WT).**

Chaque module est formé par des signatures (nœuds) fortement similaires (>90%) et participant aux mêmes mécanismes biologiques. Les cercles permettent de délimiter les modules ; Trait pointillé : modules immunologiques - Trait plein : autres modules. En rouge : les signatures up-régulées ; en vert : les signatures down-régulées ; en gris : les nœuds non partagés par les deux réseaux superposés. Nous avons obtenu les mêmes résultats pour les comparaisons B16-shVEGF/B16-WT à Jour 14 et B16-shTGFβ/B16-WT à Jour 4.

### c. Enrichissement en signatures immunologique parmi les signatures générées ?

Nous avons voulu savoir si les signatures générées pour chaque condition (WT-J4, WT-J14, V-J4, V-J14, T-J14 et T-J14) étaient significativement enrichies en signatures reliées à l'immunologie. Pour cela, un test de proportion a été réalisé comparant le nombre de signatures relatives à l'« Immunologie » parmi les signatures significatives au nombre de signatures relatives à l'« Immunologie » parmi toutes les signatures générées (significatives ou pas). Afin d'automatiser les comptages du nombre de signatures immunologiques, nous avons suivi le schéma résumé par la Figure 35. Une liste, aussi exhaustive que possible, de termes clés (tels que : *immune*, *lymphocytes*, *cytokine*..) a été définie et utilisée pour compter, parmi les listes de signatures, le nombre de signatures dont l'annotation comporte un de ces termes. C'est ainsi que sont définies les signatures « immunologiques ». Le test de proportion est ensuite réalisé sur les valeurs obtenues. Les résultats des différents tests de proportion sont résumés dans la Figure 36.



**Figure 35. Automatisation du comptage du nombre de signatures associées à des voies de signalisation immunologique.**

Condition	Condition	Nombre de signatures	Enrichissement immunitaire	P-value
B16-WT Jour 4	Pos	345	0	1
	Neg	1330	99	4.537e-06
	ALL	4635	233	
B16-shVEGF Jour 4	Pos	322	54	2.2e-16
	Neg	833	2	1
	ALL	4615	233	
B16-shTGFb Jour 4	Pos	439	96	2.2e-16
	Neg	206	0	1
	ALL	4631	230	
B16-WT Jour 14	Pos	404	0	1
	Neg	1493	152	2.2e-16
	ALL	4610	230	
B16-shVEGF Jour 14	Pos	522	117	2.2e-16
	Neg	393	0	1
	ALL	4609	229	
B16-shTGFb Jour 14	Pos	207	38	9.907e-16
	Neg	306	0	1
	ALL	4592	230	

**Figure 36. Enrichissement immunologique parmi les signatures moléculaires générées à partir des jeux de données comparant les tumeurs B16-WT au B16-shVEGF et B16-shTGF.**

L'enrichissement immunologique parmi les signatures Up-régulées et down régulées a été quantifié dans chacune des conditions d'intérêt (WT-J4, WT-J14, shVEGF-J4, shVEGF-J14, shTGF-J4 et shTGF-J14). En vert: les signatures statistiquement enrichies parmi les signatures down-régulées, en rouge : les signatures statistiquement enrichies parmi les signatures up-régulées

## 5. Conclusions de l'étude

L'utilisation d'une approche supervisée (GDE) combinée à une approche non supervisée (signatures) a permis de mettre en évidence que l'inactivation d'un seul gène au sein de la tumeur B16 déclenche une activation massive des voies de signalisation effectrices du système immunitaire. Ces mêmes voies sont complètement inhibées au niveau du microenvironnement des tumeurs sauvages (WT).

Ce phénomène de basculement Down (au niveau du microenvironnement B16-WT) → Up (au niveau du microenvironnement des tumeurs invalidées) des voies de signalisation immunologiques sera abordé dans la partie discussion.

### III. Modèle AB1-HA

Pour le modèle AB1-HA, nous nous sommes intéressés au microenvironnement tumoral ainsi qu'aux ganglions. Les microenvironnements ont été récupérés de la même façon que pour le modèle B16. Nous avons par ailleurs collecté les ganglions drainants la tumeur 2, 4 et 14 jours après l'injection des cellules tumorales ainsi que les ganglions non drainants comme contrôle. Les cellules des ganglions ont été isolées par dilacération des ganglions entre lame et lamelle puis lysées en TRIZOL. Une fois en TRIZOL, l'ARN a été extrait en suivi le protocole décrit plus haut.

En résumé, nous aurons :

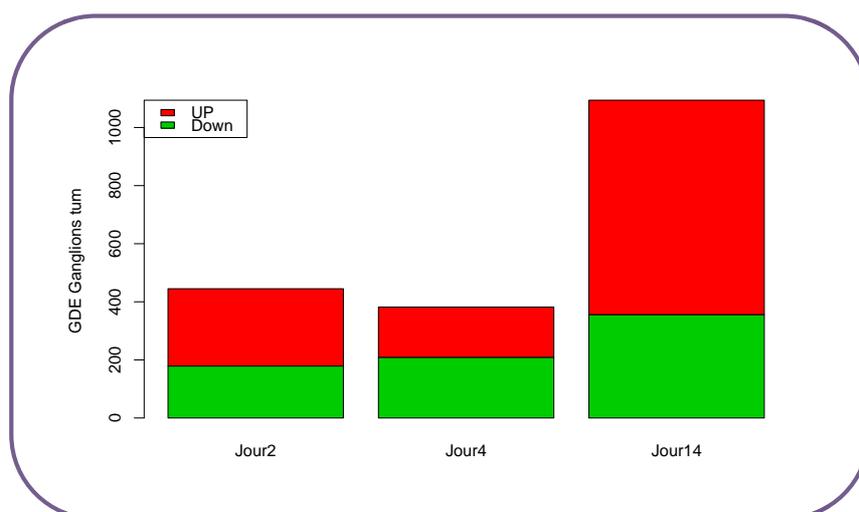
- Pour le microenvironnement tumoral : AB1-J2, AB1-J4 et AB1-J14
- Pour les ganglions : LN-J2, LN-J4 et LN-J14

#### 1. GDE au niveau des ganglions

##### a. Analyse descriptive

Les GDE ont été triés en fonction de leur valeur statistique (p-value corrigée), la Figure 37 décrit le nombre de GDE up-régulés (en rouge) et down-régulés (en vert) dans les ganglions drainants par rapport aux non-drainants (CTRL) à chacun des jours de la cinétique. On constate que le nombre de GDE est de 445 gènes (179 up-régulés et 266 down régulés) à jour 2 après l'injection de cellules tumorales (J2), de 382 (209 up régulés et 173 down régulés) à jour J4 et de 1476 gènes (356 up régulés et 738 down régulés) à jour 14 (J14).

Alors que la proportion de GDE UP- et Down-régulés dans chaque condition est globalement la même, le nombre de GDE reste stable entre J2 et J4 mais augmente plus de 4 fois à J14.



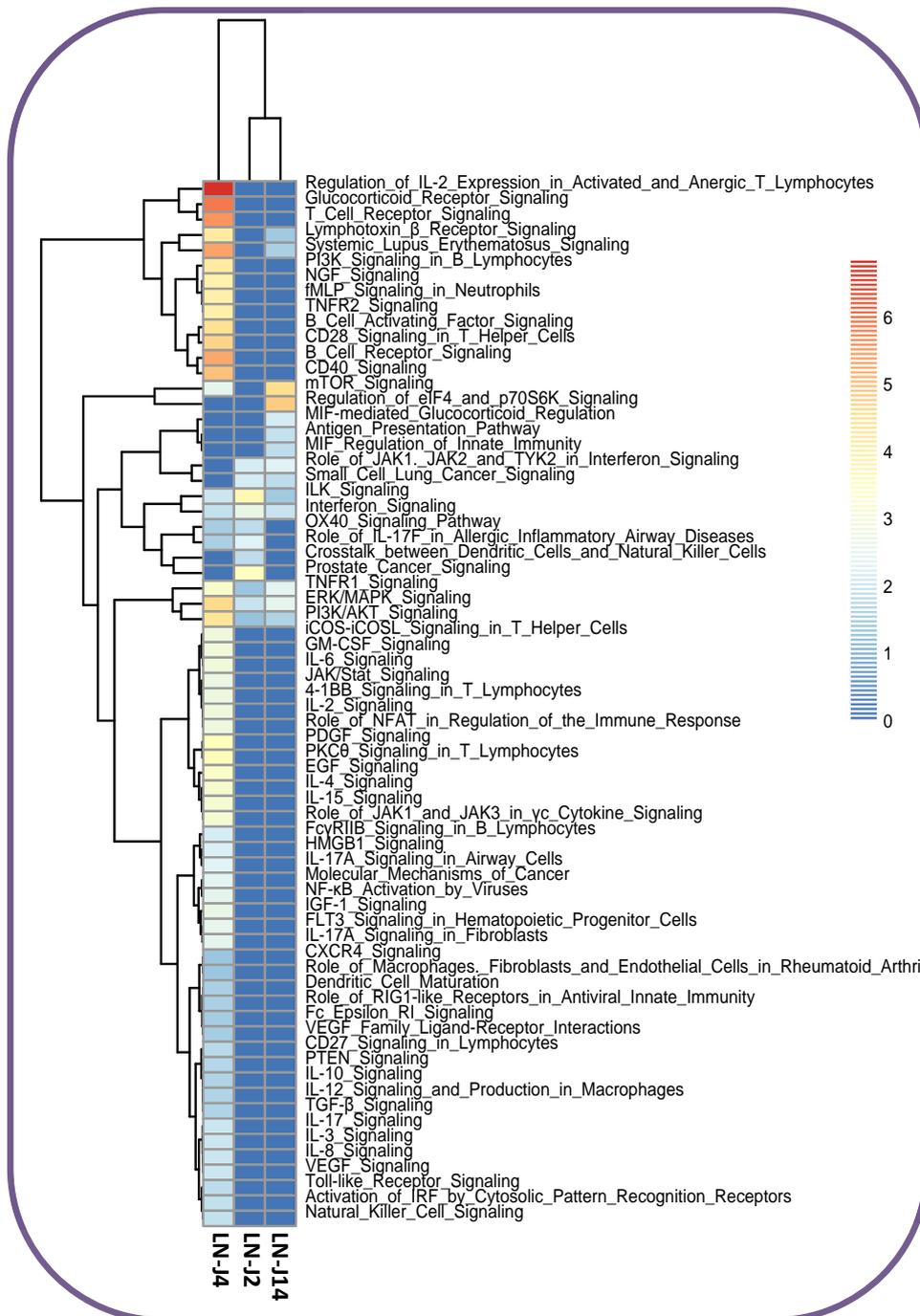
**Figure 37. Analyse descriptive des GDE dans les ganglions à J2, J4 et J14.**

Le nombre de GDE statistiquement significatifs (p-value < 0,05) générés est représenté pour chaque condition (CTRL vs. AB1-J2, CTRL vs. AB1-J4,

CTRL vs.AB1-J14). En rouge, les GDE up-régulés et en vert les GDE down régulés. CTRL = Contrôle).

#### **b. Annotation fonctionnelle**

De la même façon que précédemment, les GDE générés à partir de chaque comparaison (CTRL vs LN-J2, CTRL vs LN-J4, CTRL vs LN-J14) ont été annotés et nous avons généré les heatmaps correspondants aux voies immunologiques significativement enrichies parmi ces GDE (Figure 38). De nombreuses voies immunologiques sont significativement modulées et cette modulation s'accroît avec le temps. Cinq voies sont modulées dans les trois conditions, elles concernent les voies de signalisation de TNFR1, des interférons, PI3 kinase, ERK/MAPK et ILK. A jour 2 et 4, nous observons la modulation des mêmes voies tels que OX40, « *présentation antigénique* » ou encore « *maturation des cellules dendritiques* ». A jour 14, nous constatons une modulation massive des voies immunologiques, parmi ces voies, on retrouve des voies qui concernent entre autres les cellules T, B, ICOS, OX40, IL10 et le VEGF.



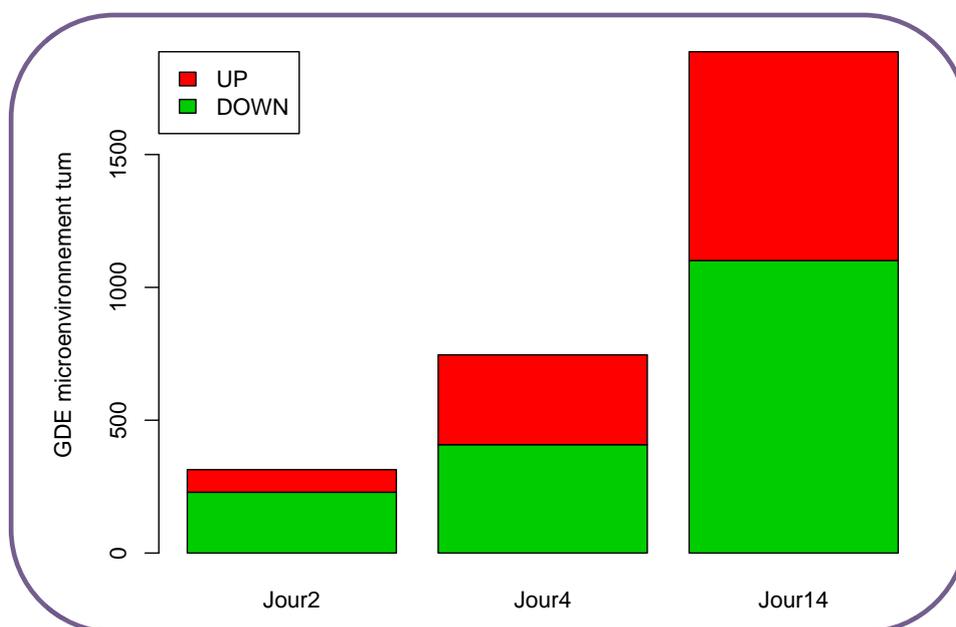
**Figure 38. Ensemble des voies de signalisation immunologiques significativement modulées au niveau des ganglions tumoraux à J2, J4 et J14 après injection de cellules tumorales.**

Sont représentés uniquement les voies de signalisation immunologiques enrichies parmi les GDE. Les voies de signalisation sont représentées par la valeur du  $-\log(p\text{-value corrigée})$ . Chaque voie est significative dans au moins une condition.

## 2. GDE au niveau du microenvironnement tumoral

### a. Analyse descriptive

Les GDE ont été triés en fonction de leur valeur statistique (p-value corrigée), la Figure 39 résume le nombre de GDE up-régulés (en rouge) et down-régulés (en vert) dans chaque condition. Le nombre de GDE est, à jour 2 après l'injection de cellules tumorales (J2), de 314 gènes (229 up-régulés et 85 down régulés), de 746 (408 up régulés et 308 down régulés), à jour J4 et de 1887 gènes (1101 up régulés et 786 down régulés) à jour 14 (J14). Comme pour les GDE, on observe globalement la même proportion de signatures UP- et Down-régulées dans chaque condition. Néanmoins, le nombre de signatures augmente de plus 2 fois entre J2 et J4 et plus de 6 fois entre J4 et J14.



**Figure 39. Analyse descriptive des GDE au niveau du microenvironnement tumoral à J2, J4 et J14.**

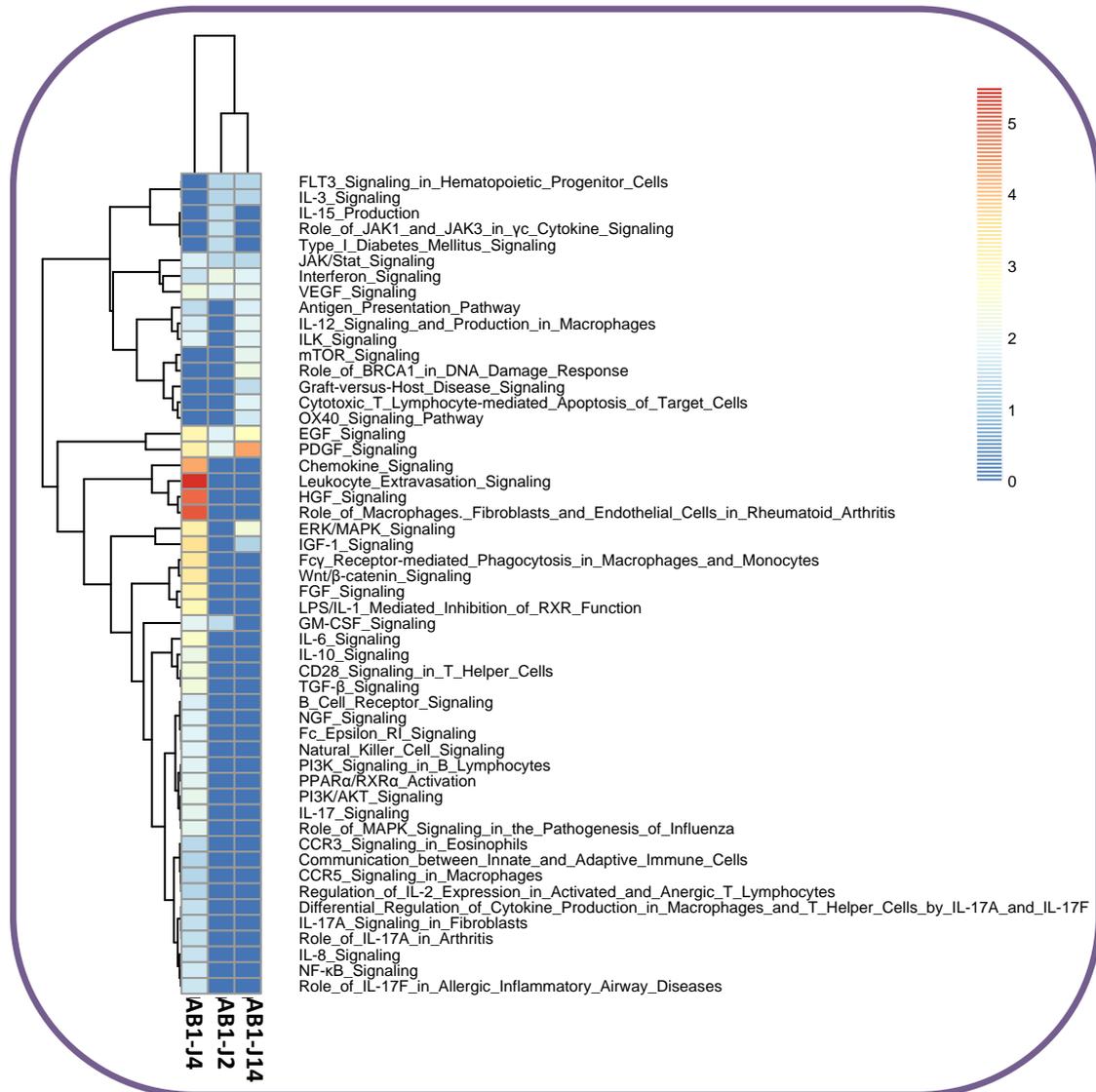
Le nombre de GDE statistiquement significatifs (p-value < 0,05) générés est représenté pour chaque condition (CTRL vs. AB1-J2, CTRL vs. AB1-J4, CTRL vs. AB1-J14). En rouge, les GDE up-régulés et en vert les GDE down régulés. CTRL = Contrôle (souris injectées avec du PBS).

### b. Annotation fonctionnelle

Les GDE identifiés à partir de chaque comparaison (CTRL vs AB1-J2, CTRL vs AB1-J4, CTRL vs AB1-J14) ont été annotés et nous avons généré les heatmaps correspondants aux voies immunologiques significativement enrichies parmi ces GDE (Figure 40). À l'image des ganglions, le microenvironnement tumoral mobilise de nombreuses voies de signalisation et cette mobilisation s'accroît avec le temps. Cinq voies sont présentes dans les trois

conditions (i) la voie Jak-Stat, (ii) la voie des interférons, (iii) la voie du VEGF, (iv) la voie de l'EGF et enfin (v) la voie du PDGF.

A jour 2, on observe la modulation des voies de l'IL15, l'IL3 et FLT3. A jour 4, nous observons une modulation du GMSF, de mTOR, OX40 ainsi que de l'IL12 dans les macrophages. A jour 14, on constate une forte modulation concernant les cellules macrophages, les leucocytes, l'IL6, l'IL10, TGF $\beta$ , IL17 et d'autres molécules.



**Figure 40. Ensemble des voies de signalisation immunologiques significativement modulées au niveau du microenvironnement tumoral à J2, J4 et J14.**

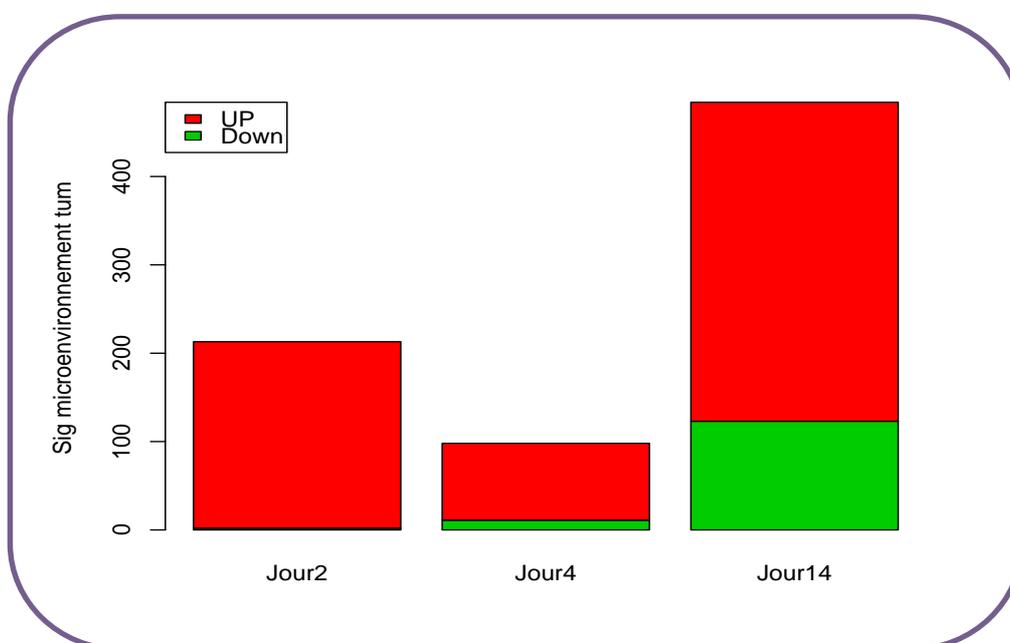
Seules les voies de signalisation immunologiques enrichies parmi les GDE sont représentées sur la base de leur valeur du  $-\log$  (p-value corrigée). Chaque voie est significative dans au moins une condition.

### 3. Signatures au niveau du microenvironnement tumoral

#### a. Analyse descriptive

La Figure 41 décrit le nombre de signatures moléculaires statistiquement entre les microenvironnements tumoraux (AB1-J2, AB1-J4 et AB1-J14) et la condition contrôle (échantillon de peau loin du site tumoral), A jour 2 après injection de cellules tumorales (J2), le nombre de signatures significatives est de 213 (2 up-régulées et 211 down régulées), alors qu'à J4 ce nombre passe à 98 (11 up-régulées et 87 down régulées) et enfin à J14 le nombre de signatures est de 484 (123 up-régulées et 361 down régulées).

Contrairement aux ganglions, on observe, dans le microenvironnement tumoral, un déséquilibre entre les signatures UP- et Down-régulées dans chaque condition (en faveur des signatures UP). Le nombre de signatures diminue plus deux fois entre J2 et J4 et augmente plus de 6 fois entre J4 et J14.



**Figure 41. Analyse descriptive des signatures au niveau du microenvironnement tumoral à J2, J4 et J14.**

Le nombre de GDE statistiquement significatifs (p-value corrigée < 0,05) générés est représenté pour chaque condition (CTRL vs. AB1-J2, CTRL vs. AB1-J4, CTRL vs. AB1-J14). En rouge, les GDE up-régulés et en vert les GDE down régulés. CTRL = Contrôle (souris injectées avec du PBS).

## b. Réseau de modules fonctionnels de signatures

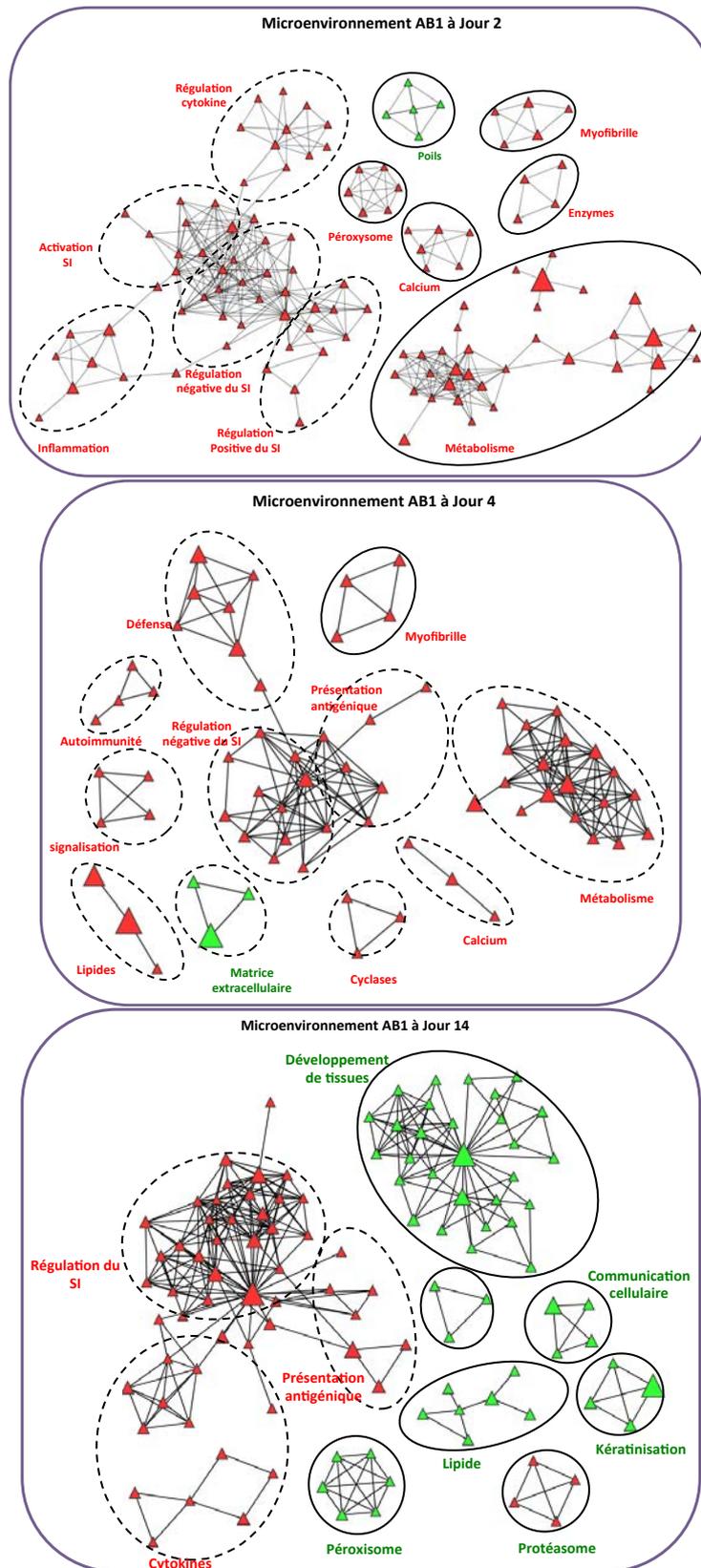
Comme décrit précédemment, les signatures moléculaires identifiées comme statistiquement enrichies par GSEA ont été analysées de manière globale en utilisant le plugin « enrichment map » du logiciel Cytoscape (comme abordé dans la partie méthodologie). Les réseaux produits à partir des microenvironnements des tumeurs AB1 à J2, J4 et à J14 sont représentés par la Figure 42. On constate une up-régulation (dés J2) à la fois des modules contenant les voies immunologiques activatrices et régulatrices. Les modules concernant le métabolisme, l'inflammation, myofibrille mais aussi calcium. Cette up-régulation s'accroît à J14.

A jour 2 et 4 peu de modules sont down-régulés, or à jour 14 on constate une down régulation de nombreux modules tels que « kératinisation », « communication cellulaire », « protéasome », « proxisome ». Nous nous sommes intéressés de plus près aux signatures contenues dans les modules immunologiques aussi bien à J2, J4 qu'à J14 et nous nous avons identifié un enrichissement en signatures régulatrices c'est à dire des signatures qui contiennent des gènes participants aux voies de signalisation des cellules régulatrices tels que CD25, Foxp3, CTLA4. Cette observation intrigante et la dichotomie entre les deux modèles tumoraux seront discutées dans [II]

En parallèle, nous avons analysé en détails toutes les signatures moléculaires générées et parmi celles-ci deux ont attiré notre attention. La première est une signature dite « Tregs » car publiée dans le cadre d'une étude, réalisée par *Marson et al* qui avait pour objectif de comprendre les mécanismes de la régulation des gènes cibles de foxp3. Cette signature s'appelle « *Marson\_Foxp3\_Target\_Up* » et contient des gènes tels que ETS1, S100A6, MCL1. (Marson et al., 2007).

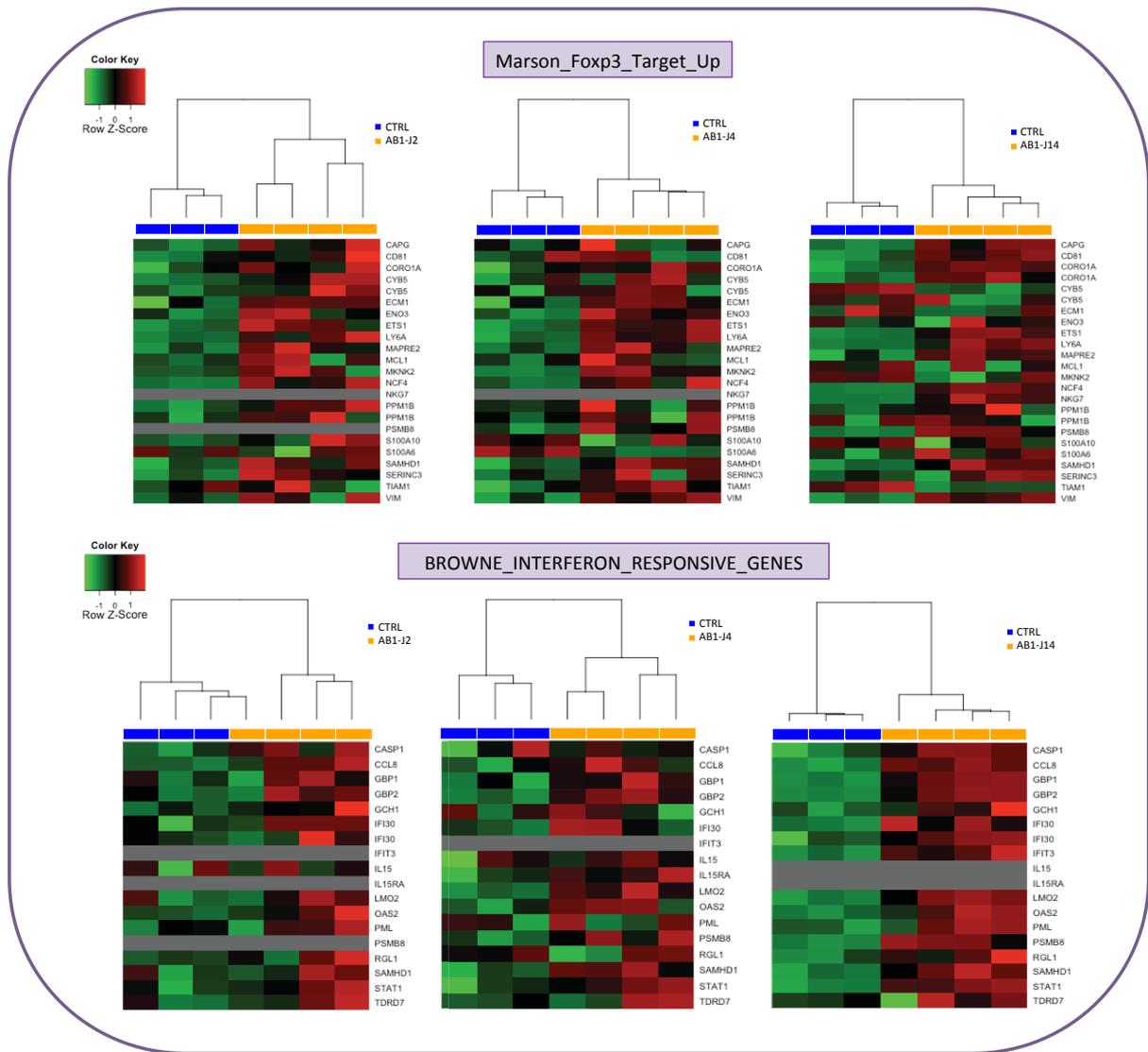
La deuxième signature a été décrite dans un article publié par de *Browne et al*. Il s'agit d'une signature effectrice car elle contient les gènes de la voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$  (tels que STAT1, OAS2, IFIT3, CCL8), elle s'appelle « *Browne\_Interferon\_responsive\_Genes* ».

La Figure 43 met en évidence que ces deux signatures séparent parfaitement les différents groupes d'intérêt (J2, J4 et J14) du groupe contrôle (CTRL). Ceci suggère un rôle à la fois du versant effecteur et régulateur de la réponse immunitaire anti-tumorale.



**Figure 42. Réseaux de modules fonctionnels de signatures moléculaires représentant le microenvironnement tumoral « AB1 » à jour 2, 4 et 14 après injection de cellules tumorales.**

Chaque triangle représente une signature moléculaire et la taille du triangle est proportionnelle au nombre de gènes présents dans la signature. Trait pointillé = modules immunologiques. En rouge : les signatures up-régulées ; en vert : les signatures down-régulées. Trait plein = autre modules. SI = Système immunitaire.

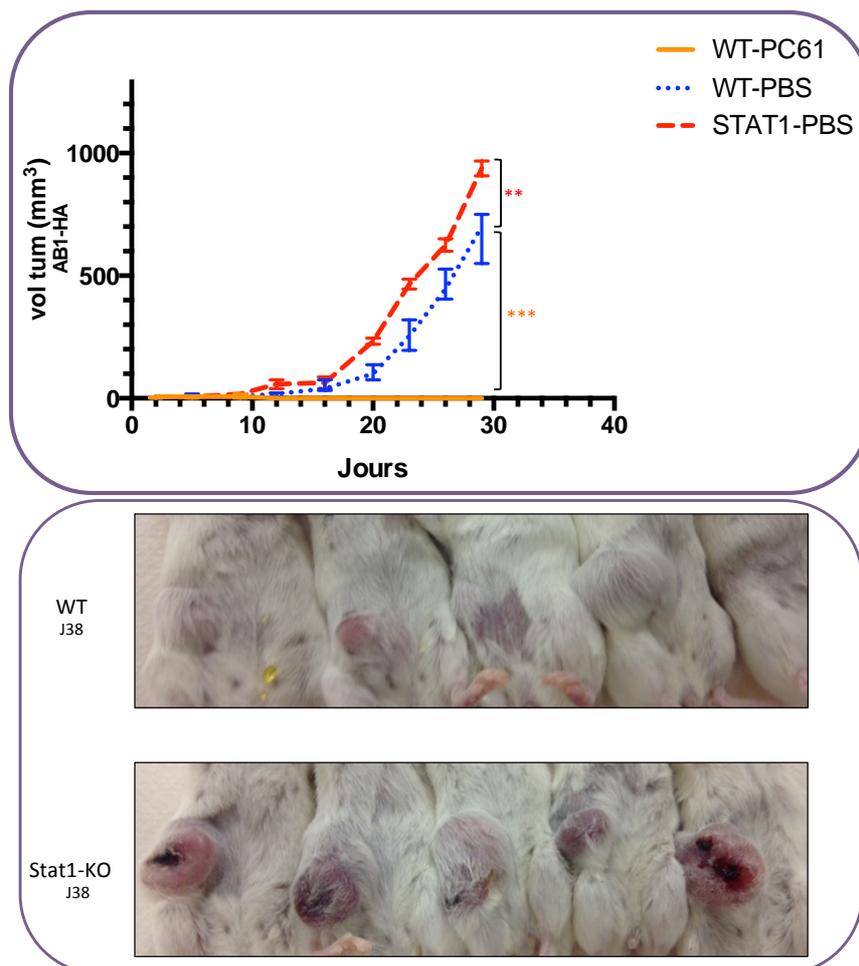


**Figure 43. Heatmap représentant deux signatures moléculaires d'intérêt.**

Deux signatures (*Marson\_Foxp3\_Target\_Up* et *Browne\_Interferon\_responsive\_Genes*) sont représentées ici. Une classification (clustering) a été réalisée sur la base des profils d'expression des gènes composant les signatures à chaque condition (J2, J4 ou J14 après injection de cellules tumorales). En orange = Groupe d'intérêt (microenvironnement tumoral à J2, J4 ou J14 après injection de cellules tumorales). En bleu = groupe contrôle (CTRL).

Au niveau de l'expression génique : en rouge = gènes up-régulés, en vert = gènes down-régulés, en gris = gène de la signature non détecté au sein du jeu de données.

Afin de vérifier et valider ces observations, à savoir un rôle crucial à la fois du versant effecteur et régulateur de l'immunité anti-tumorale, nous avons injecté les tumeurs AB1 d'une part dans des souris STAT1-KO et d'autre part, dans des souris où les cellules Tregs ont été éliminées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la chaîne alpha du récepteur de l'IL2, le clone PC61 de l'anticorps anti-CD25a. Les résultats de cette expérience montrent qu'en absence de STAT1, un gène crucial et central de la voie de l'interféron- $\gamma$ , la croissance tumorale est significativement augmentée par rapport aux souris sauvages. De plus, l'élimination des cellules Tregs permet une élimination totale et rapide (dès le 9<sup>ème</sup> jour) des cellules tumorales injectées (Figure 44).



**Figure 44. Cinétique de croissance tumorale (AB1) des souris sauvages (WT) et souris STAT1-KO.**

Le volume tumoral a été mesuré chez des souris BALB/c sauvages, injectées avec du PBS (WT-PBS) et chez des souris STAT1-KO. La mesure a été effectuée tous les 2 jours (cinétique, en haut) et les souris sacrifiées à jour 38 (photos, en bas). Le volume tumoral ( $V$ ) est calculé selon la formule :  $V = (L \cdot l^2) / 2$ ,  $L$  étant la longueur de la tumeur et  $l$  la largeur. L'injection du PC61 (anti-CD25) s'est faite en intra-péritonéale un jour avant l'injection des cellules tumorales. Une quantité de 125  $\mu$ g a été suffisante pour éliminer plus 80% des Tregs (vérifiée par marquage CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> dans le sang). Cette expérience est représentative d'au moins 5 expériences indépendantes.

#### 4. Conclusions de l'étude

Cette étude du modèle AB1, une tumeur fortement immunogène, met en évidence une activation précoce du système immunitaire. En analysant les données transcriptomiques issues des ganglions ainsi que du microenvironnement tumoral, nous avons démontré une mobilisation des voies immunitaires majeures incluant aussi bien le bras effecteur du système immunitaire que le bras régulateur. En effet, l'analyse des données transcriptomiques a mis en évidence la up-régulation de gènes et signatures impliqués dans la voie de l'interféron- $\gamma$  mais aussi dans les voies de régulation du système immunitaire. Ces observations ont été validées grâce à l'utilisation d'une part des souris invalidées pour le gène STAT1 et des souris déplétées en Tregs d'autre part.

En définitive, la modulation induite dans ce modèle caractérise par un profil d'expression différent de celui précédemment décrit (modèle B16-WT), c'est une observation à la fois intéressante et intrigante, elle sera discutée dans la partie [AB1 vs. B16... Un modèle, un profil d'expression].

## **Chapitre II. Etude transcriptomique comparative de l'interface fœto-maternelle (IFM) et du microenvironnement tumoral**

Ce chapitre s'intéresse dans un premier temps à l'étude transcriptomique de l'interface fœto-maternelle (IFM) et dans un second temps à la comparaison entre cette interface et le microenvironnement tumoral (modèle B16).

### **I. Analyse transcriptomique de l'interface fœto-maternelle**

#### **1. Protocole expérimental**

Quatre, six, huit, dix, onze et douze jours après l'implantation du fœtus, les sites d'implantation (utérus + fœtus) et les utérus de souris non gestantes (comme contrôle) ont été prélevés sur des souris C57Bl6. Les sites d'implantation ainsi obtenus ont été stockés dans du RNALater pour être ensuite broyé et homogénéiser grâce à des billes métalliques (TissuLyser). L'extraction des ARNs totaux a été réalisée en suivant le protocole fourni dans le kit « QIAGEN RNeasy plus mini » et la concentration en ARN mesurée par Nanodrop. L'ARN pouvant être dégradé lors de l'extraction, il a été nécessaire de réaliser un contrôle de leur qualité en utilisant le Bioanalyseur *Agilent*, seuls les ARNs ayant un RIN (RNA Integrity Number) supérieur à 8 ont été utilisés pour l'étude du transcriptome via la technologie Illumina (puces MouseWG-6 v2.0).

Nous avons constitué 7 groupes expérimentaux :

*Groupe 1* : les souris **NP** (Non Pregnant= non gestantes), c'est le groupe contrôle.

*Groupe 2* : groupe de souris gestantes au 4<sup>ème</sup> jour après l'implantation du fœtus : **E4**.

*Groupe 3* : groupe de souris gestantes au 6<sup>ème</sup> jour après l'implantation du fœtus : **E6**.

*Groupe 4* : groupe de souris gestantes au 8<sup>ème</sup> jour après l'implantation du fœtus : **E8**.

*Groupe 5* : groupe de souris gestantes au 10<sup>ème</sup> jour après l'implantation du fœtus : **E10**.

*Groupe 6* : groupe de souris gestantes au 11<sup>ème</sup> jour après l'implantation du fœtus : **E11**.

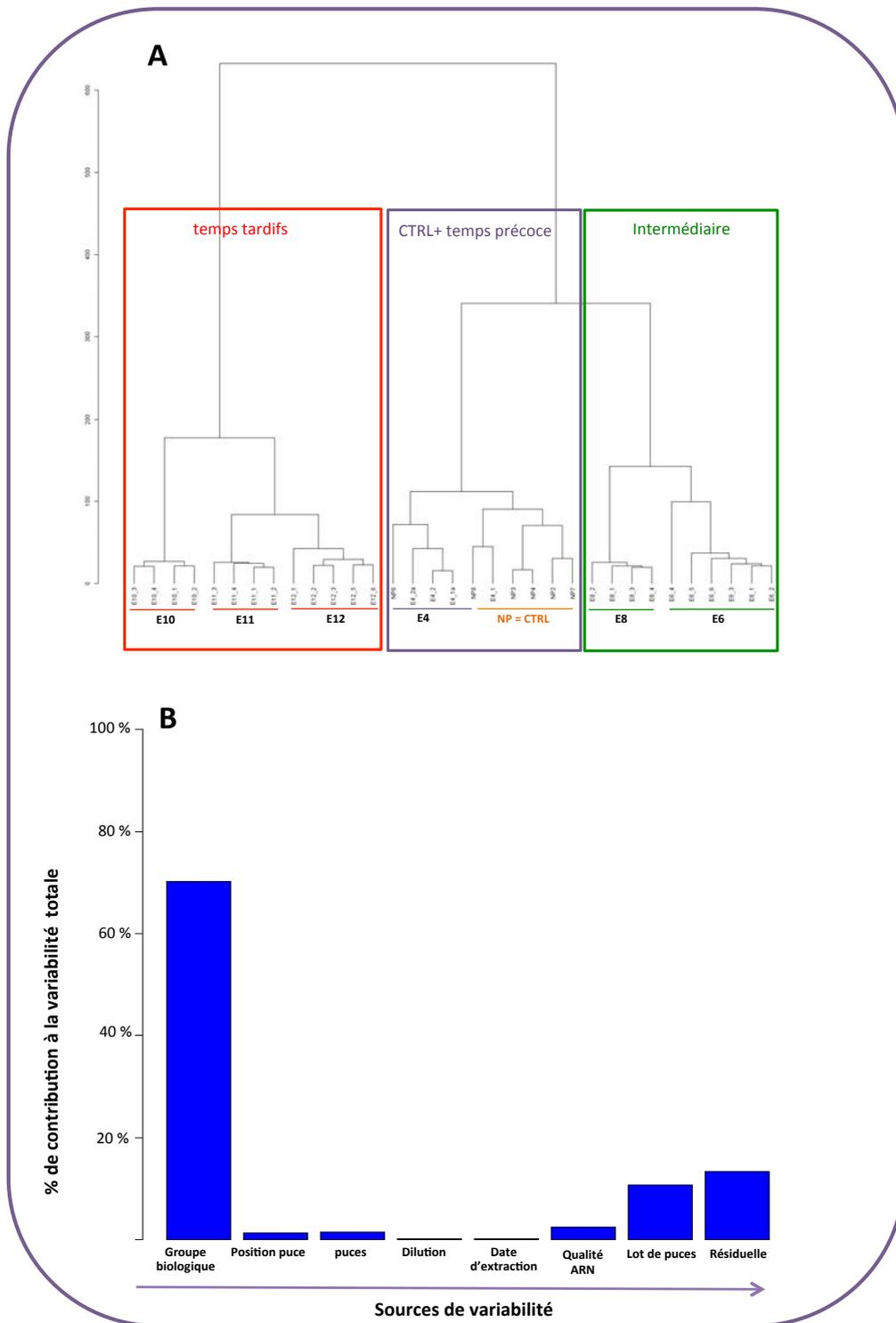
*Groupe 7* : groupe de souris gestantes au 12<sup>ème</sup> jour après l'implantation du fœtus : **E12**.

Chaque groupe est constitué de 4 souris, à l'exception du groupe NP pour lequel nous avons 6 souris.

#### **2. Contrôle qualité**

Face au grand nombre de groupes expérimentaux, nous nous sommes intéressés à la variabilité globale au sein de notre jeu de données grâce à PVCA. Comme décrit dans la Figure 12, cet outil permet d'évaluer la contribution de chaque source de variabilité potentielle (facteur connu par l'expérimentateur) au sein de la variabilité globale au sein du système étudié. Comme l'indique la Figure 45, la classification non supervisée basée sur

l'expression génique met en évidence une bonne séparation des différents groupes expérimentaux. Nous constatons qu'on peut former 3 groupes : le groupe « temps tardifs » qui contient les sous-groupes E10, E11 et E12, le groupe « temps intermédiaire » avec E8 et E6, et enfin le groupe « temps précoce » qui est constitué des contrôle et les E4. De plus, nous avons analysé la contribution de chaque source de variabilité dans la variabilité globale du jeu de données. Nous avons testé sept sources : les groupes biologiques, c'est à dire la variabilité globale expliquée par les groupes biologiques, cette source explique 70% de la variabilité ; 10% de la variabilité est expliquée par le lot de puce et la position des échantillons au sein de la puce, la qualité de la puce, la dilution des échantillons, la date d'extraction des ARN et la qualité de l'ARN extraits (RIN) expliquent individuellement moins de 1% de la variabilité totale. On observe 13% de la variabilité résiduelle, c'est à dire que 13% de variabilité totale n'est expliquée par aucun des facteurs que nous avons testé. De plus, la classification non supervisée basée sur l'expression génique met en évidence une bonne séparation des différents groupes expérimentaux. Trois groupes se forment : le groupe « temps tardifs » regroupant les sous-groupes E10, E11 et E12, le groupe « temps intermédiaire » avec E8 et E6, et enfin le groupe « temps précoce » qui est constitué des NP et des E4.



**Figure 45. Analyse de variabilité du jeu de données IFM.**

**A.** Classification non supervisée basée sur l'expression génique des différents groupes expérimentaux. NP = Non Pregnant = non gestantes (groupe contrôle), E4, E6, E8, E10, E11 et E12= groupes souris gestantes à 4, 6, 8, 10, 11 ou 12 jours après l'implantation de l'embryon. **B.** Le poids (% de contribution à la variabilité totale) des sources de variabilité a été apprécié avec PVCA : différentes sources de variabilité connues ont été testées (Groupe biologique, position dans la puce, la qualité de la puce, la dilution, la qualité de l'ARN et le lot de puces).

### 3. GDE au niveau de l'IFM

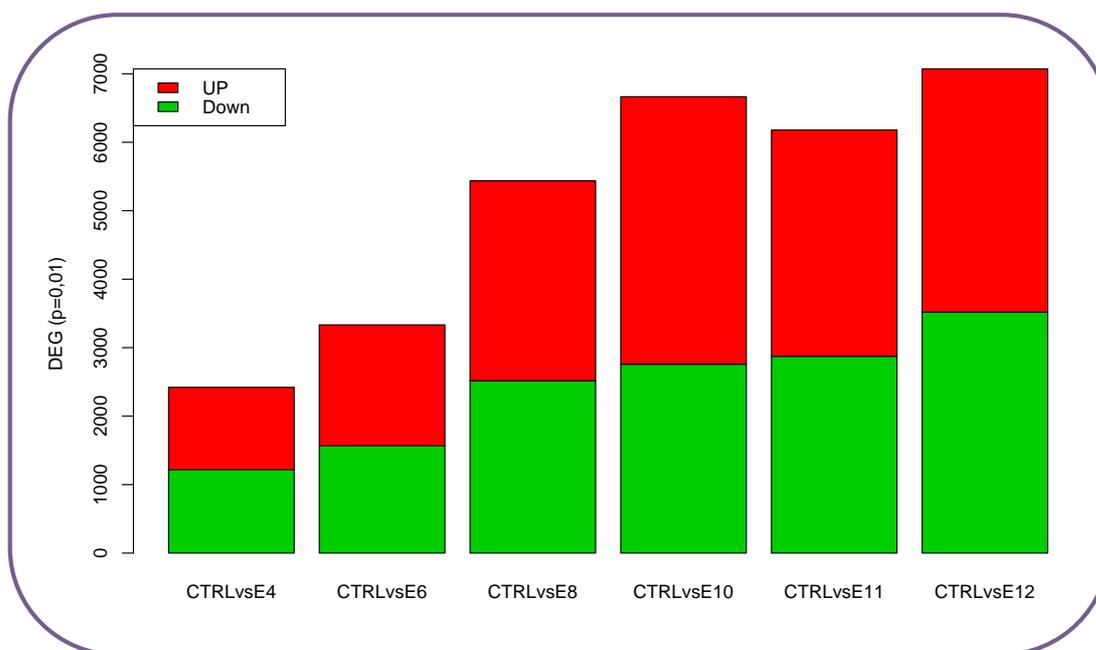
Une fois la qualité du jeu de données vérifiée et validée, nous avons généré puis analysé les GDE entre le groupe contrôle et les différents groupes expérimentaux.

#### a. Analyse descriptive

Les GDE ont été triés en fonction de leur valeur statistique (p-value corrigée, ici p-value corrigée = 0,01). La Figure 46 décrit le nombre de GDE up-régulés (en rouge) et down-régulés (en vert) dans chaque condition et le Tableau 2 résume le nombre de GDE au sein de chaque condition. On observe globalement le même nombre de GDE UP- et Down-régulés dans chaque condition et en comparant le nombre de GDE à entre les jours (après l'implantation du fœtus), on constate qu'il augmente jusqu'à E10 pour se stabiliser par la suite.

Condition	Nombre de GDE	Nombre de GDE-UP	Nombre de GDE-Down
E4	2421	1216	1205
E6	3333	1766	1567
E8	5435	2917	2518
E10	6665	3907	2758
E11	6179	3305	2874
E12	7072	3552	3520

**Tableau 2. Nombre de GDE significativement enrichies au sein de chaque condition (CTRL vs.E4, CTRL vs.E6, CTRL vs.E8, CTRL vs.E10, CTRL vs.E11, CTRL vs.E12).**

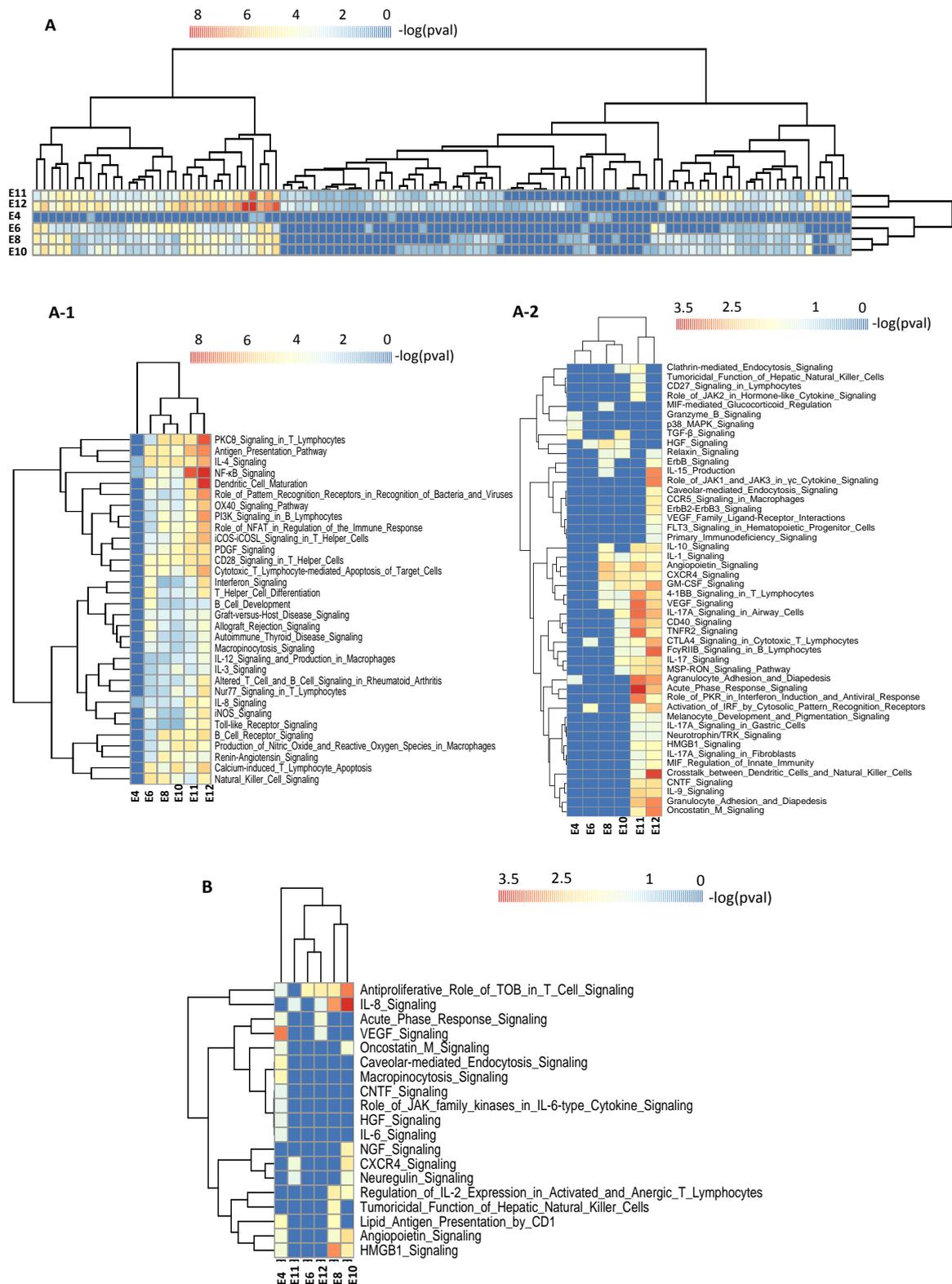


**Figure 46. Analyse descriptive des GDE au niveau de l'interface fœto-maternelle à E4, E6, E8, E10, E11 et E12.**

Le nombre de GDE statistiquement significatifs (p-value corrigée < 0,01) générés est représenté pour chaque condition (CTRL vs.E4, CTRL vs.E6, CTRL vs.E8, CTRL vs.E10, CTRL vs.E11, CTRL vs.E12). En rouge, les GDE up-régulés et en vert les GDE down régulés. CTRL = Contrôle (souris non gestantes). p-value corrigée =  $10^{-2}$

### b. Annotation fonctionnelle

Les GDE Up et down régulés obtenus à partir de chaque comparaison (CTRL vs. E4, CTRL vs.E6, CTRL vs.E8, CTRL vs.E10, CTRL vs.E11 et CTRL vs.E12) ont été annotés séparément au moyen d'IPA ce qui nous a permis de déterminer au sein de quel « compartiment » (GDE-up ou GDE-down) les voies de signalisation immunitaires sont enrichies. Les voies de signalisation immunologiques enrichies au sein des GDE-up et down sont résumées par la Figure 47. Il sort de cette figure que les voies immunologiques est majoritairement enrichies au sein des GDE down-régulés en comparaison avec les GDE up-régulés. Parmi ces voies, on trouve les voies de signalisation clés de l'immunité anti-tumorale tel que « présentation antigénique », « maturation des cellules dendritiques » ou encore « voie de signalisation des interférons ». Parmi les voies enrichies au sein des GDE up-régulés se trouve, de façon intéressante, la présence des voies impliquant entre autres l'IL8 et le VEGF comme discuté dans la partie [Immunothérapies combinatoires].



**Figure 47. Ensemble des voies de signalisation immunologiques significativement modulées au niveau de l'IFM à E4, E6, E8, E10, E11 et E12.**

Classification hiérarchique des voies de signalisation immunologiques significativement enrichies à E4, E6, E8, E10, E11 et E12 au niveau de l'IFM parmi les GDE (A), down régulés et (B) up-régulés. Pour des raisons de lisibilité, nous avons généré automatiquement 2 cluster (A-1 et A-2) à partir de A. Chaque voie est significative dans au moins une condition. Les heatmap ont été produits en fonction des valeurs statistiques ( $-\log(p\text{-value corrigée})$ ) attribuées à chaque voie de signalisation enrichie.

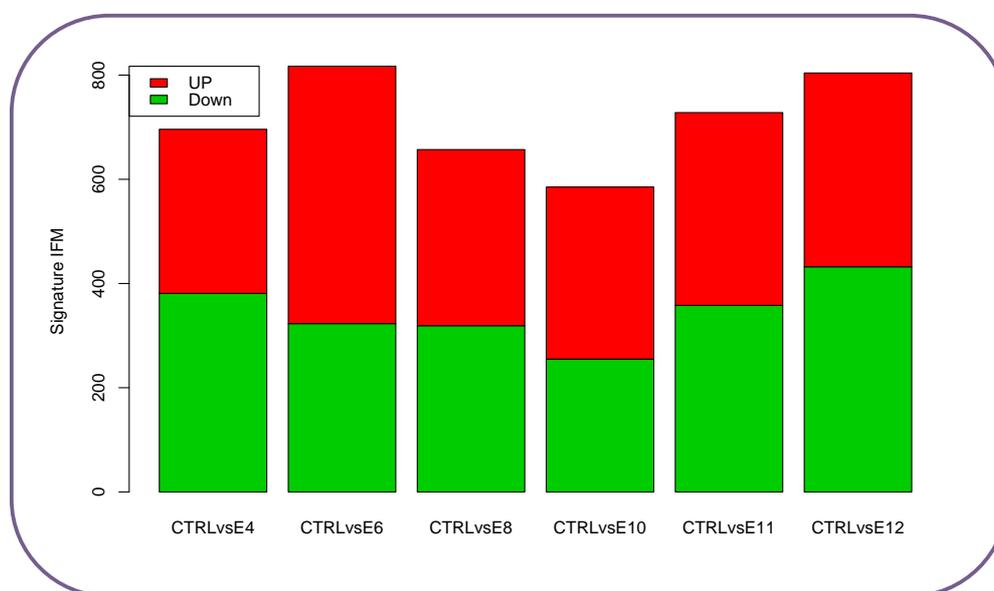
#### 4. Signatures moléculaires au niveau de l'IFM

##### a. Analyse descriptive

La Figure 48 décrit le nombre de signatures moléculaires statistiquement enrichies à la sortie de GSEA et le nombre de ces signatures est résumé au niveau du Tableau 3. On observe globalement le même nombre de signatures UP- et Down-régulées dans chaque condition et en comparant le nombre de signatures à entre les jours (après l'implantation du fœtus), on constate qu'il reste relativement stable.

Condition	Nombre de signatures	Nombre de signatures-UP	Nombre de signatures-Down
E4	696	315	381
E6	817	494	323
E8	657	338	319
E10	585	330	255
E11	728	370	358
E12	804	372	432

**Tableau 3. Nombre de signatures moléculaires significativement enrichies au sein de chaque condition (CTRL vs. E4, CTRL vs. E6, CTRL vs. E8, CTRL vs. E10, CTRL vs. E11, CTRL vs. E12).**



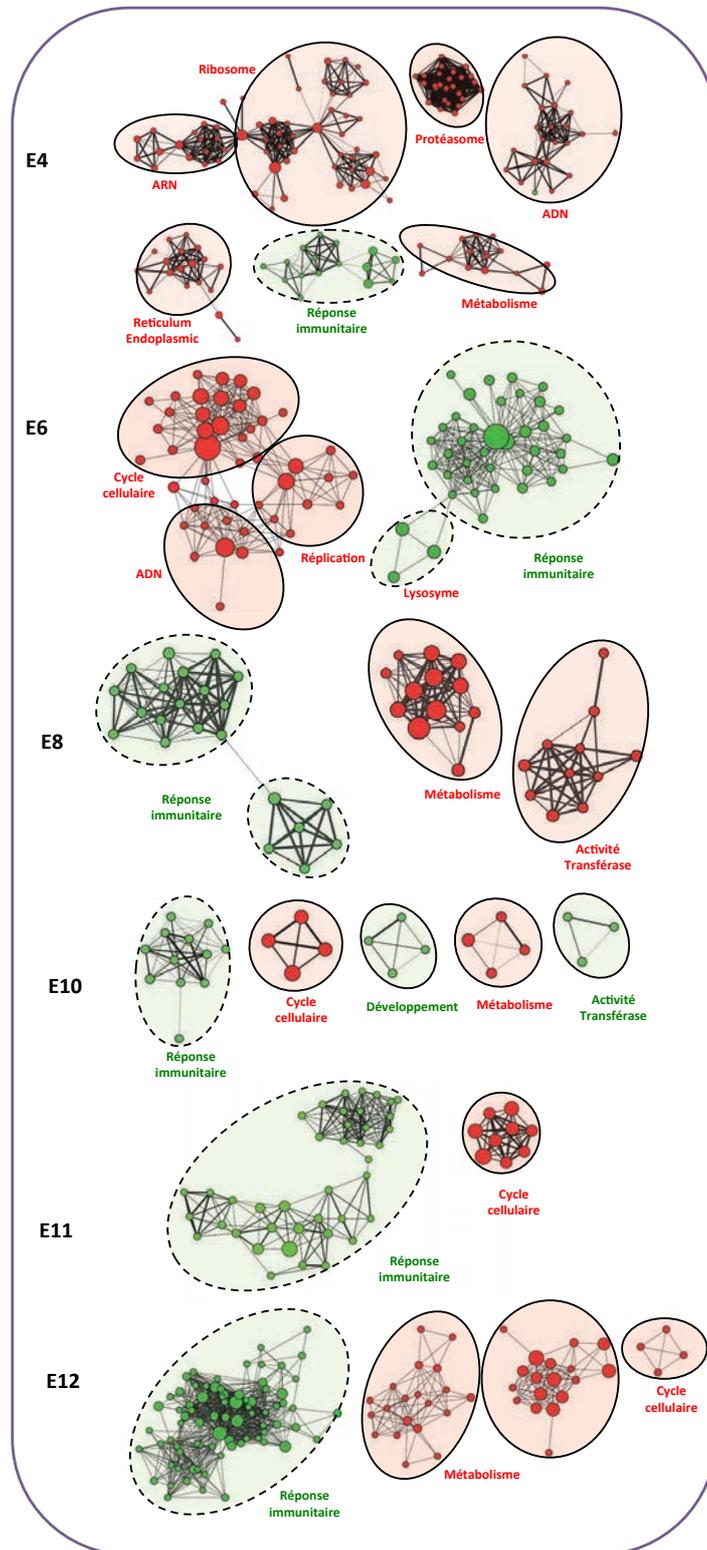
**Figure 48. Analyse descriptive des signatures au niveau de l'interface foëto-maternelle à E4, E6, E8, E10, E11 et E12.**

Le nombre de GDE statistiquement significatifs (p-value corrigée < 0,01) générés est représenté pour chaque condition (CTRL vs.E4, CTRL vs.E6, CTRL vs.E8, CTRL vs.E10, CTRL vs.E11, CTRL vs.E12). En rouge, les GDE up-régulés et en vert les GDE down régulés. CTRL = Contrôle (souris non gestantes).

## b. Réseau de modules fonctionnels de signatures

Comme décrit précédemment, les signatures moléculaires statistiquement enrichies à partir de GSEA ont été analysées de manière globale en utilisant le plugin « enrichment map » du logiciel Cytoscape. Les réseaux générés à partir des signatures à E4, E6, E8, E10, E11 et E12 sont représentés par la Figure 49. A E4 et E6, alors que l'on constate une up régulation des modules associés à la *synthèse d'ADN, d'ARN, métabolisme* et au *protéasome*, les voies immunologiques sont down-régulés. De la même manière, à E8, on observe une up-régulation des modules associés au *métabolisme* et à *l'activité transférase* alors que les voies immunologiques restent down régulées. A E10, on constate une diminution du nombre de signatures composant les modules (à p-value identique aux autres conditions). De plus, les modules annotés *cycle cellulaire et métabolisme* sont up régulés alors que ceux annotés *réponse immunitaire, activité transférase et développement* sont down-régulés. A E11, on constate une up régulation du module *cycle cellulaire* et un down-régulation massive de la réponse immunitaire. Finalement à E12, la down régulation massive des voies immunologiques est maintenue alors que les modules associés au *métabolisme* et au *cycle cellulaire* sont up-régulés.

Globalement, cette figure met donc en évidence une up-régulation des modules fonctionnels liés au *cycle cellulaire, ADN, ARN* ainsi qu'au *métabolisme* alors que les modules down-régulés sont quant à eux composés de signatures associées à la réponse immunitaire, englobant ainsi de nombreuses voies telles que la *présentation antigénique, la production de cytokines*, ou encore *l'activation du système immunitaire*.



**Figure 49. Réseau de modules fonctionnels de signatures moléculaires représentant l'interface fœto-maternel à jour 4, 6, 8, 10, 11 et 12 après implantation du fœtus.**

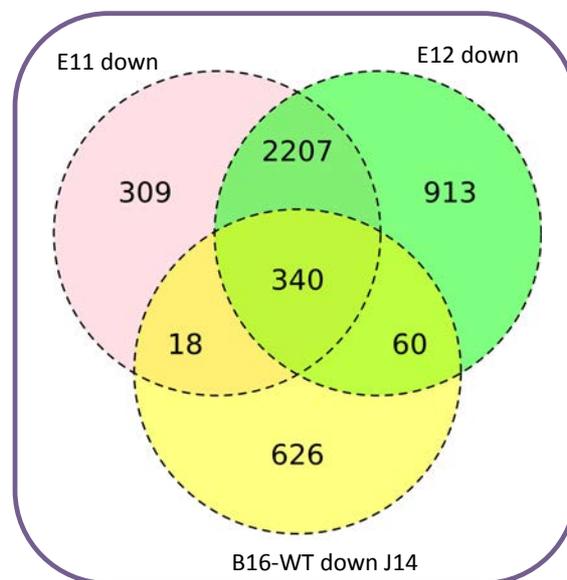
Les signatures (générées par ICA + sélectionnées à partir des bases et littératures) issues de GSEA sont représentées. Chaque signature est représentée par un nœud et un ensemble de nœuds appartenant à la même voie biologique est regroupé en modules. La taille des cercles ou nœuds représente le nombre de gènes qui les compose et l'épaisseur du trait la similarité entre nœuds. Un indice de similarité (entre les nœuds du même module) de 80% a été sélectionné avec une p-value corrigée  $=5 \cdot 10^{-3}$  pour (E6 à E12) et  $5 \cdot 10^{-2}$  pour E4. Les modules immunologiques sont représentés en pointillé.

## II. Comparaison IFM vs Microenvironnement tumoral

En s'appuyant sur l'hypothèse selon laquelle un phénomène de tolérance est induit afin de stopper les tentatives de rejet déclenchées par système immunitaire effecteur de l'hôte au niveau du microenvironnement tumoral ainsi qu'au niveau de l'interface fœto-maternelle (IFM), nous avons généré et analysé deux jeux de données, l'un issu du microenvironnement tumoral (B16-WT) et l'autre de l'IFM qui nous ont permis de valider notre hypothèse. Nous nous sommes intéressés par la suite aux similarités et/ou différences potentiels au niveau des mécanismes responsables de ce phénomène de tolérance en comparant le jeu de données B16-WT à celui de IFM.

### 1. Comparaison des GDE

Les GDE des deux jeux de données ont été comparés. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence un ensemble de gènes qui sont partagés par les deux microenvironnements (cancer et IFM). La Figure 50 est un exemple de comparaison comparant les GDE issues du microenvironnement B16-WT à jour 14 et les GDE issus de E11 et E12. En effet, devant le très grand nombre de comparaison, nous n'avons pas pu tout représenter sur une même figure. Près d'un tiers des GDE B16-WT sont en commun avec les GDE E11 et E12 reflétant une grande similarité entre ces GDE. Concernant les autres conditions, nous avons obtenu des résultats similaires en comparant B16-WT down J4 à E4 down et E6 down, à savoir un partage d'un tiers des GDE.



**Figure 50. Comparaison des GDE IFM vs. Cancer.** Les GDE générés à partir de chaque comparaison « Cancer » ont été comparés à ceux générés à partir de l'IFM. Nous avons obtenues de fortes similitudes en comparant les autres conditions entre elles.

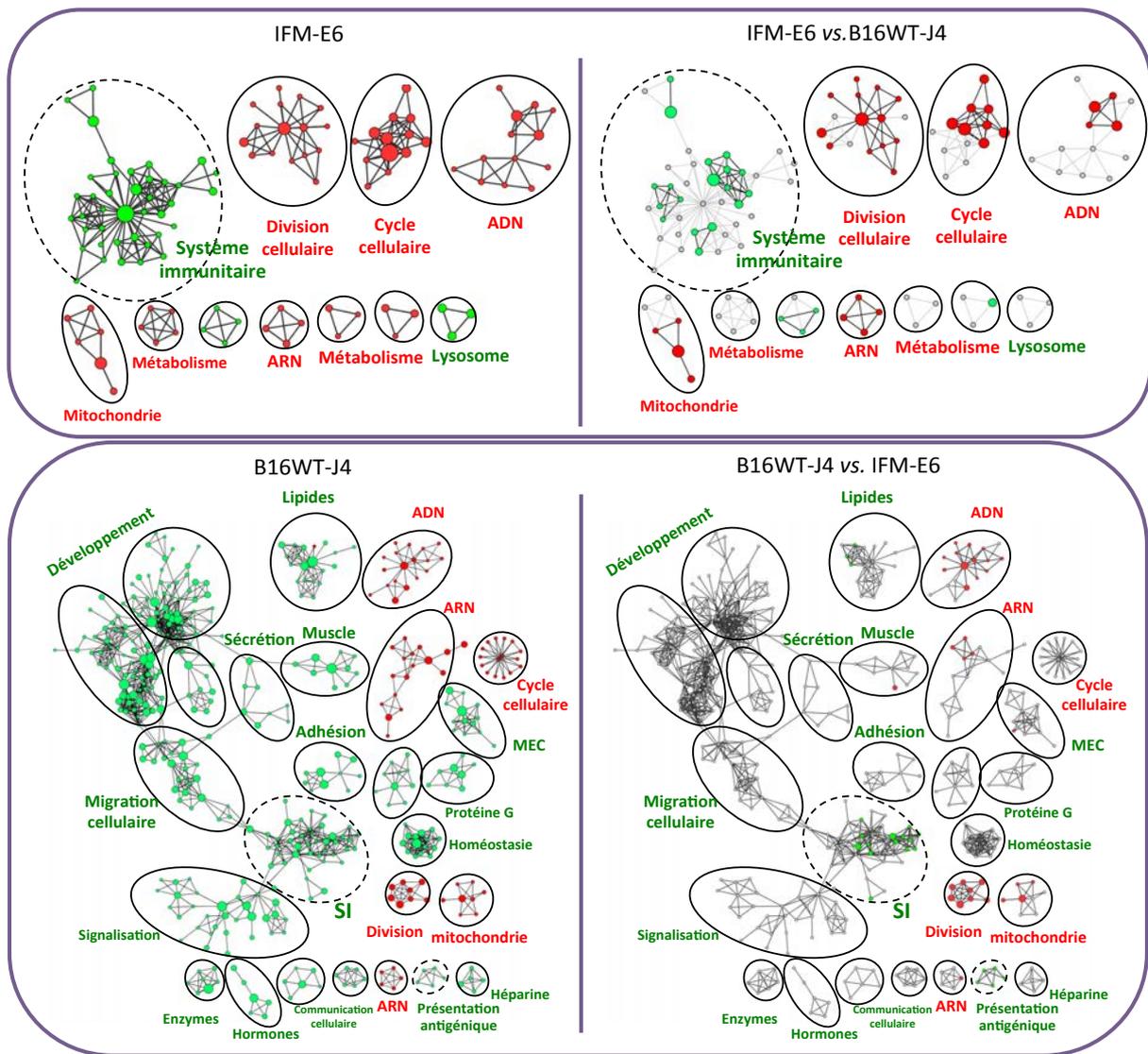
## 2. Comparaison des signatures moléculaires

La comparaison des signatures générées à partir du jeu de données IFM et de celles générées à partir du jeu cancer (B16-WT) a été réalisée d'une part sur les signatures des bases de données et d'autre part sur les signatures spécifiques générées à partir d'ICA.

### a. Signatures issues des bases de données

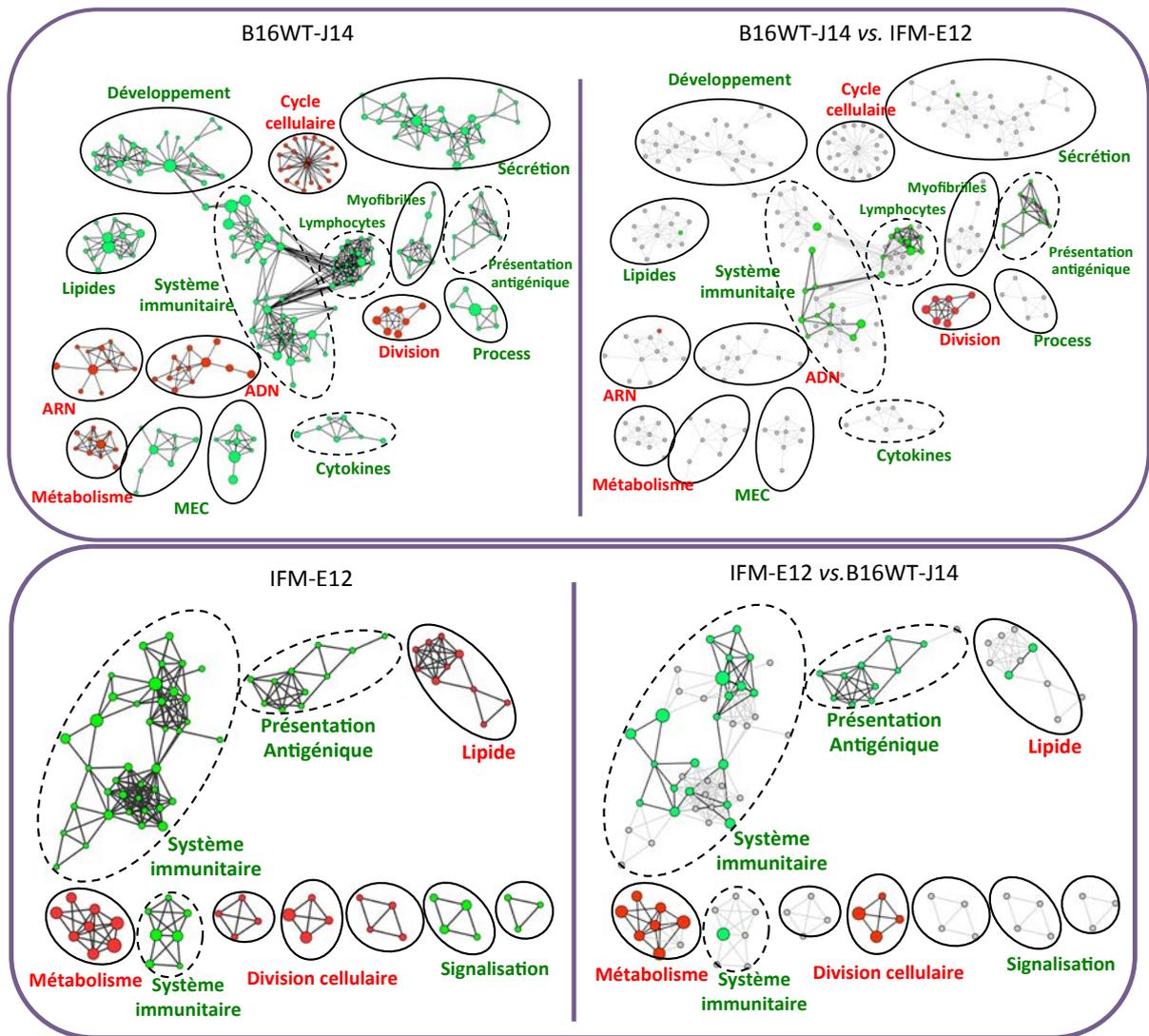
Nous avons superposé le réseau de modules fonctionnels issus de B16-WT sur celui issu de l'IFM et *vice versa*, à J4 (Figure 51) et à J14 (Figure 52).

Tout d'abord, ces deux figures mettent en évidence le nombre plus important de signatures au niveau du microenvironnement tumoral en comparaison avec les signatures issues de l'IFM (à p-value égale). Ensuite, il existe des signatures communes aussi bien up ou down régulées. Finalement, parmi les signatures down régulées communes, on observe un enrichissement immunologique or, parmi les signatures communes up régulées, on constate un enrichissement métabolique. En effet, les nœuds down-régulés en commun font partie des modules associés aux mécanismes immunitaires tels que la *présentation antigénique*, *cytokines* ou encore *régulation du système immunitaire*, alors que les nœuds up-régulés en commun appartiennent aux modules de *division cellulaire*, *cycle cellulaire*, *ADN* ou encore *ARN*. Cette observation est vraie à Jour 4 (ou E6) et jour 14 (E12).



**Figure 51. Comparaison des réseaux fonctionnels du microenvironnement des tumeurs B16-WT à J4 au réseau IFM (E6) et inversement.**

Chaque signature issue de GSEA est représentée par un nœud et un ensemble de nœuds appartenant à la même voie biologique est regroupé en modules. La taille des nœuds représente le nombre de gènes qui les composent et l'épaisseur du trait la similarité entre nœuds. Seuls les nœuds avec un indice de similarité (au sein d'un même module) de 90% ont été sélectionné avec une p-value corrigée  $=5 \times 10^{-3}$ . En rouge = nœuds up-régulés, en vert = nœuds down-régulés et en gris = nœuds non partagés par les deux réseaux superposés. Les modules immunologiques sont représentés en pointillé

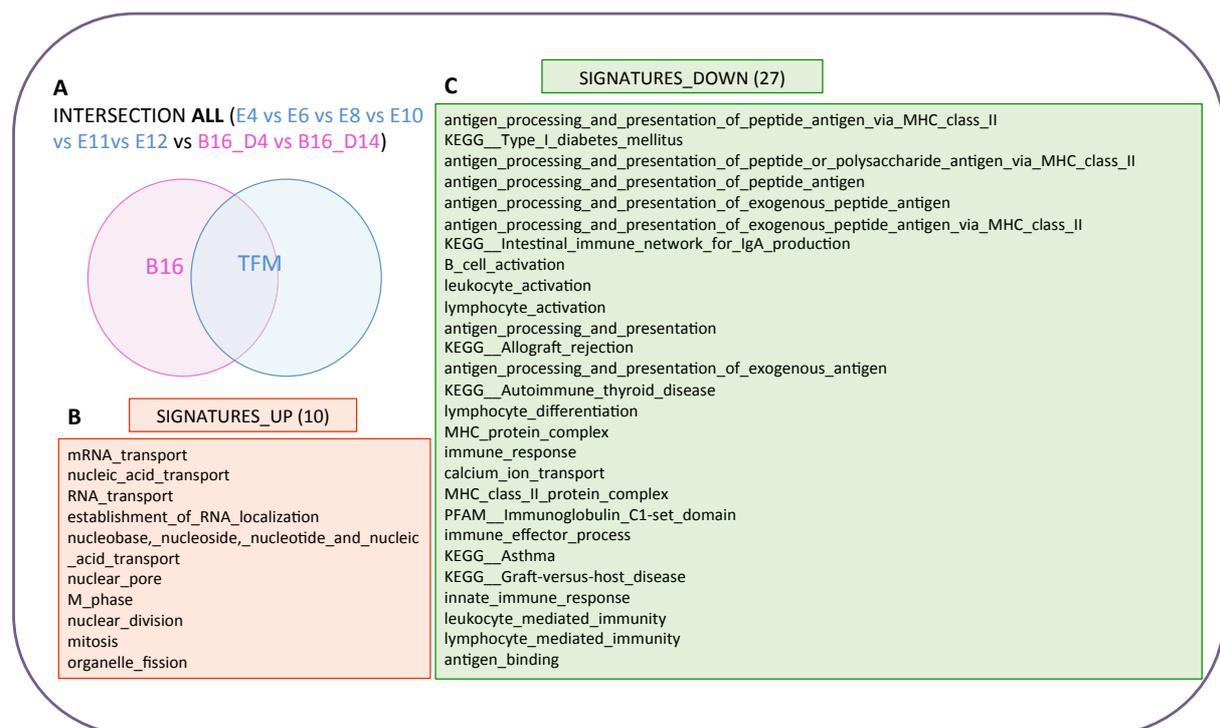


**Figure 52. Comparaison des réseaux fonctionnels du microenvironnement des tumeurs B16-WT à J14 au réseau IFM (E12) et inversement.**

Chaque signature issue de GSEA est représentée par un nœud et un ensemble de nœuds appartenant à la même voie biologique est regroupé en modules. La taille des nœuds représente le nombre de gènes qui les composent et l'épaisseur du trait la similarité entre nœuds. Seuls les nœuds avec un indice de similarité (au sein d'un même module) de 90% ont été sélectionnés avec une p-value corrigée  $=5 \times 10^{-3}$ . En rouge = nœuds up-régulés, en vert = nœuds down-régulés et en gris = nœuds non partagés par les deux réseaux superposés.

Par la suite, nous avons comparé l'ensemble des signatures moléculaires significativement enrichies une fois testées sur les jeux de données B16 –WT (J4 et J14) et IFM (E4 →E12). Le résultat de l'intersection entre toutes les signatures (B16 et IFM) traduit le phénomène général observé précédemment, à savoir que les signatures communes down-régulées sont associées à des voies immunologiques alors que les signatures communes up-régulées appartiennent aux voies métaboliques et de division cellulaire. En effet, parmi les signatures down-régulées partagées par toutes les conditions on retrouve différentes voies immunologiques tels que *la présentation antigénique* ou *l'activation des cellules B et T* alors que les signatures communes up-régulées sont associées à *cycle cellulaire, métabolisme moléculaire* ou *transport d'ARN* (Figure 53).

Ce résultat résume parfaitement nos observations à savoir qu'à la fois au niveau du microenvironnement tumoral et de l'IFM une down-régulation (en partie commune) du système immunitaire et up-régulation (en partie commune) du système métabolique et de la division cellulaire.



**Figure 53. Intersection entre toutes les signatures moléculaires générées à partir des jeux de données Cancer, B16-WT et IFM.**

Toutes les signatures (GO) significatives pour le jeu de données cancer (B16) ont été comparées à celles significatives pour le jeu de données IFM (A). Les signatures UP- et Down-régulées en commun sont représentées respectivement en rouge (B) et en vert (C).

## b. Signatures issues de ICA : ND036 (B16-WT) et ND038 (IFM)

### *Similarité entre les signatures ... Jaccard-GoSemSim*

Après l'analyse des signatures issues de la littérature communes aux deux jeux de données, nous nous sommes proposé de comparer les signatures issues d'ICA, qui sont les signatures propres à chaque jeu de données. Les signatures ND036 représentent les signatures générées à partir du jeu de données « B16-WT » alors que les signatures ND038 sont celles générées à partir du jeu de données « IFM ».

Pour ce faire, nous avons mis en place une analyse de similarité entre les quatre listes de signatures générées à partir des deux jeux de données :

1<sup>ère</sup> liste : les signatures ND036-UP,

2<sup>ème</sup> liste : les signatures ND036-DOWN,

3<sup>ème</sup> : les signatures ND038-UP,

4<sup>ème</sup> : les signatures ND038-DOWN

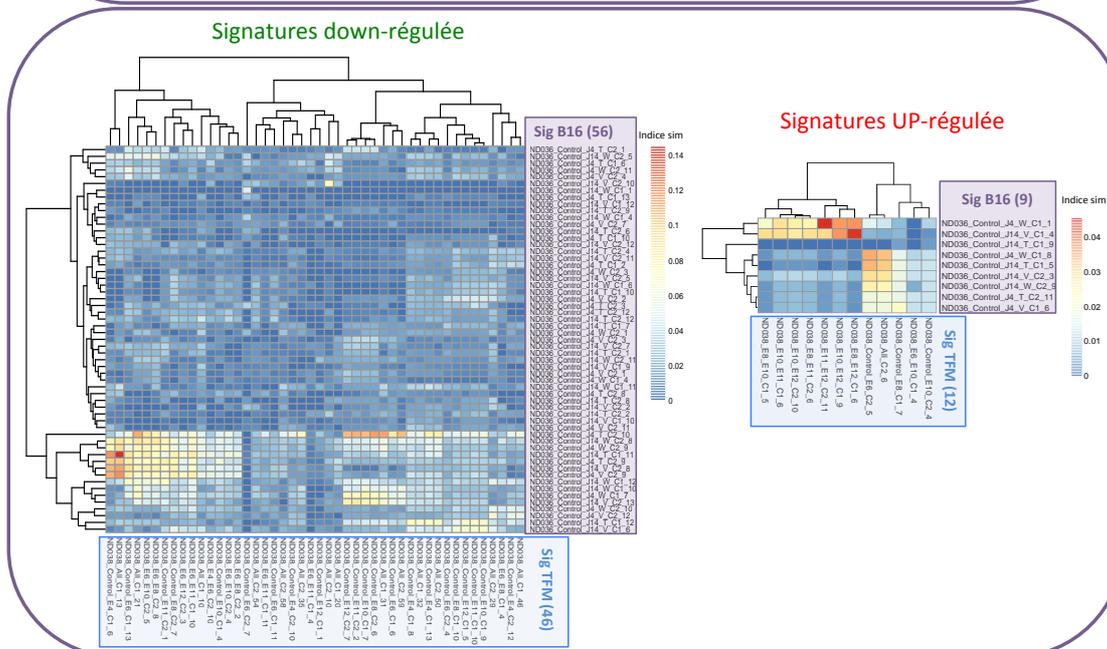
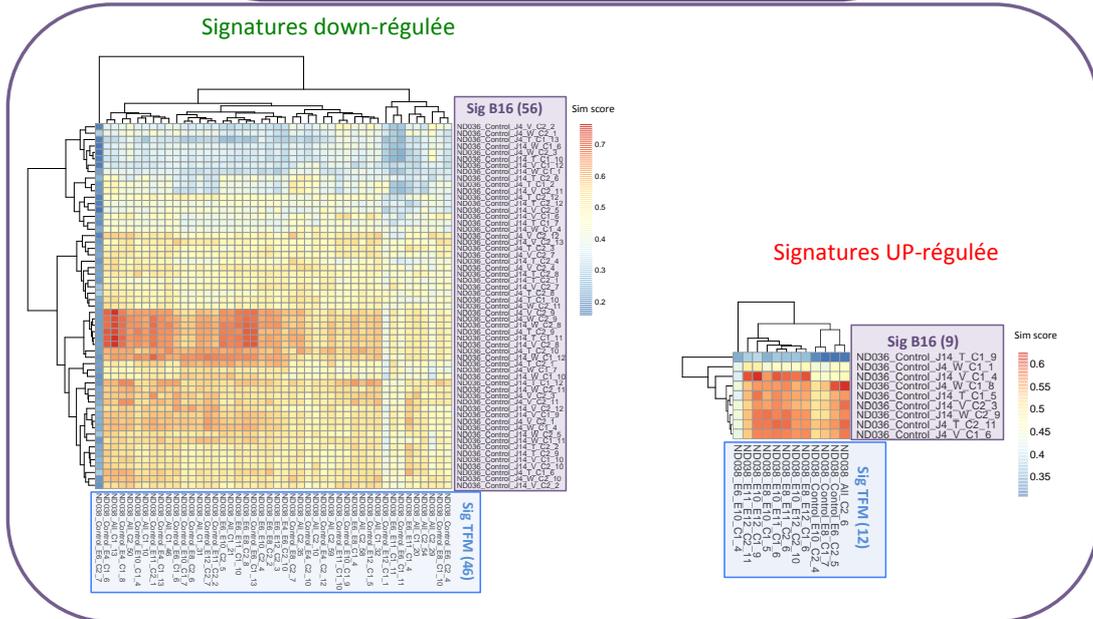
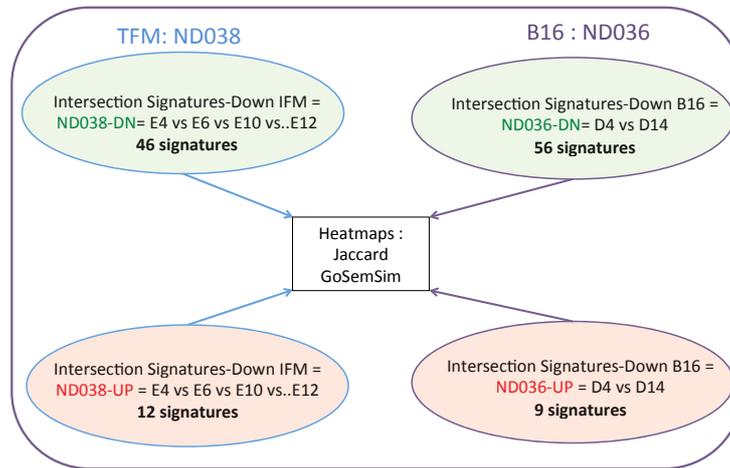
La similarité a été appréciée de deux manières. La première a été de mesurer la similarité en termes de composition génique (comparaison des signatures gène à gène = *Jaccard*) et la seconde a été de s'intéresser à la similarité entre leurs annotations (*GoSemSim=GSS - Yu et al., 2010*) comme résumé par la Figure 54.

Quatre heatmaps (2 heatmaps par méthode) ont été produit, les deux premiers présentent les résultats du *GSS* (corrélation de signature Down = heatmap 1, signatures DOWN = heatmap 2) alors que les deux autres présentent les résultats du *Jaccard* (corrélation de signature Down = heatmap 3, signatures DOWN = heatmap 4).

Les heatmaps représentant les indices de similarité entre les signatures ND036 et ND038 montrent une faible similarité entre la signature UP alors que celle-ci est très forte au sein des signatures DOWN (jusqu'à 80% de similarité). Les valeurs de *Jaccard* montrent une très faible similarité entre les signatures up-régulées et les signatures down-régulées qui sont globalement différentes à l'exception de quelques signatures. Ces dernières ont été analysées en détails et nous avons constatés qu'elles étaient toutes associées à des voies immunologiques.

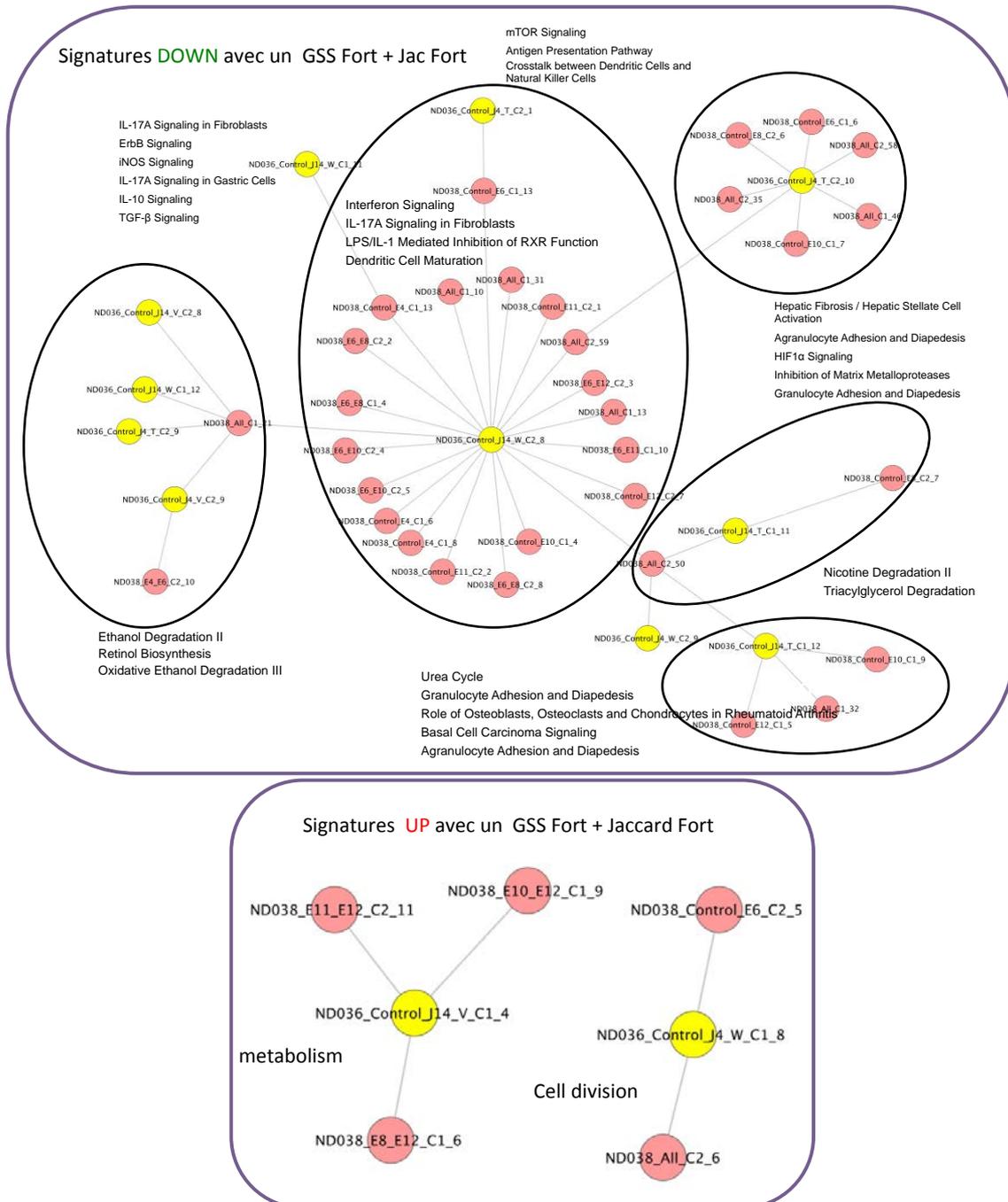
### *Fort Jaccard-Fort GSS*

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux signatures ayant un fort *Jaccard* et un fort *GSS*, qui correspondent en théorie aux signatures les plus similaires entre elles parmi toutes les signatures générées à partir des deux jeux de données. Un réseau de ces signatures a été généré et les modules composant ce réseau ont été annotés, nous avons ainsi produit un réseau de signature-up et un réseau de signatures-down (Figure 55).



**Figure 54. Similarités entre les signatures moléculaire Cancer, B16 (ND036) vs. signatures IFM (ND038). TFM = Tolérance Fœtomaternelle**

La Figure 55 met en évidence que les signatures up fortement similaires sont annotés « métabolisme » et « cycle cellulaire » alors que les signatures down ayant un fort (GSS et jaccard) sont annotés « voie de signalisation des interférons », « voie de signalisation de l'IL17 », « présentation antigénique » ou encore « cycle de l'urée ». Ces observations viennent confirmer les observations précédentes à savoir un enrichissement immunologique au sein des signatures down-régulées communes entre les deux jeux de données et un enrichissement métabolique au sein des signatures up-régulées communes.



**Figure 55. Réseau de modules fonctionnels de signatures ayant un fort GSS et un fort Jaccard.**

Les signatures avec un fort Jaccard et un fort GSS (fortement similaires) forment un réseau. Les signatures « B16-WT, ND036 » sont en jaune et les signatures « IFM, ND038 » en rouge.

### **3. Conclusions de l'étude**

De cette étude, nous pouvons conclure que:

- Au niveau de l'interface fœto-maternelle, les voies de signalisation immunologiques sont globalement inhibées.
- La comparaison d'IFM et cancer a permis de mettre en évidence une forte similarité entre les signatures down-régulés enrichies en voies de signalisation immunologiques

## **IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

### **Chapitre I. Le microenvironnement sous la loupe de l'Immunologie des systèmes**

Ce chapitre va aborder dans un premier temps le choix de l'approche systémique pour l'étude du microenvironnement tumoral et de l'interface foeto-maternelle. Dans un second temps, l'utilité de ces signatures et leur utilisation en thérapies seront discutées.

#### **I. Pourquoi l'approche systémique ?**

Comme exposé dans le Chapitre II, le microenvironnement tumoral ainsi que l'interface foeto-maternelle sont d'une telle complexité qu'il est nécessaire de prendre en compte toutes les composantes de ces deux systèmes. En effet, ces deux microenvironnements sont finement régulés par différents types cellulaires et de surcroît impliquent des milliers de gènes simultanément. En effet, nous avons pu mettre en évidence des changements spectaculaires au niveau du microenvironnement tumoral de la lignée sauvage B16-WT en comparaison avec les deux lignées invalidées (B16-shVEGF et B16-shTGF). Aussi, nous avons révélé de fortes similarités entre le microenvironnement tumoral B16-WT et l'IFM. Cela a été possible grâce à l'utilisation de l'approche systémique mais n'aurait sûrement pas été le cas de manière aussi frappante en utilisant des approches classiques telles que la cytométrie en flux ou autres. En effet, les développements technologiques et bioinformatiques en biologie moléculaire et analyse de données complexes offrent la possibilité, par les approches systémiques, d'apprécier ces différentes composantes et de décomposer les différentes voies impliquées dans les phénomènes observés de manière fine et robuste.

#### **II. Pourquoi utiliser des signatures et ne pas se contenter des gènes ?**

##### **1. Quel est l'intérêt d'utiliser des signatures ?**

Dans diverses études de pathologies humaines, la transcriptomique est devenu un outil mature pour la génération de profils d'expressions géniques et l'utilisation de cette l'approche est justifiée par la notion de synergie entre les gènes. En effet, aucun gène n'est exprimé de façon complètement indépendante des gènes qui l'entoure dans le génome humain. Néanmoins, l'analyse transcriptomique est couramment abordée par l'identification des GDE. Or, le niveau d'expression d'un gène donné est régulé par des combinaisons spécifiques de variables cellulaires et est souvent la résultante de plusieurs phénomènes tels que les boucles de régulation, ou encore des relations indirectes entre gènes. ICA autorise l'identification des gènes dont l'expression est corrélée et va permettre la génération de signatures moléculaires prenant en considération des différences parfois impossible à mettre en évidence avec une analyse des gènes différentiellement exprimés (GDE). Ceci va avoir comme conséquence la

mise en évidence de phénomènes spécifiques à l'expérience d'intérêt et potentiellement la mise en relation de phénomènes que l'on pensait distincts. L'analyse « réductionniste » des GDE ne reflète pas suffisamment la complexité sous-jacente aux mécanismes de régulation - souvent mal connus d'ailleurs- ayant lieu au niveau du microenvironnement tumoral et de l'interface foeto-maternelle.

## **2. Des signatures générées par hasard ?**

La génération et l'utilisation des signatures moléculaires pour l'interprétation biologique des données transcriptomiques est utile et informative car elle permet d'accéder à des informations souvent inaccessibles avec les méthodes classiques d'analyse de données. Néanmoins, la question qui mérite d'être posée est : « *Les signatures générées ici sont-elles plus pertinentes que si elles avaient été produites au hasard ?* »

Afin de répondre à cette question, **Venet et al** (Venet et al., 2011) se sont intéressés à des signatures moléculaires issues de la littérature et annotées « cancer du sein », c'est à dire que ces signatures ont permis la séparation d'un groupe de patientes saines et un groupe de patientes atteintes de cancer du sein. Ils ont pu mettre en évidence qu'à nombre identique de gènes, 60% des signatures testées (47 signatures) ne permettaient pas une meilleure prédiction en comparaison à des signatures générées au hasard. Ils expliquent cela par le fait que ces signatures ont été générées par des méthodes de classification classiques peu robustes tels que l'analyse des « meilleurs » dix GDE (Top 10) ou encore en s'appuyant sur des profils générés par PCR quantitative. Cette étude pointe l'importance de la façon dont les signatures sont générées et définies. En effet, énormément de listes de gènes issus de publications sont appelés, à tort, « signatures moléculaires ».

Ces conclusions appuient la pertinence de l'utilisation, pour nos données, de signatures bien définies, à savoir des signatures issues de l'ontologie GO et des signatures spécifiques du jeu de données d'intérêt et générées grâce à une méthode non supervisée ICA.

## **3. Pourquoi ICA pour l'extraction des signatures ?**

Toutes les méthodes non supervisées permettent potentiellement d'extraire des signatures moléculaires. Pour l'analyse des données transcriptomiques, deux méthodes non supervisées ont été utilisées : l'analyse par composante principale (ACP, V-ChapI-II-4a) et l'ICA (V-ChapI-III-3b). De nombreuses publications mettent en évidence que l'utilisation de l'ICA est bien plus adaptée que l'ACP (Engreitz et al., 2010). En effet, **Carpentier et al** ont comparé de nombreux outils statistiques appliqués aux données transcriptomiques parmi lesquels l'ACP, ils ont conclu que ICA était l'outil le plus adapté (Carpentier et al., 2004).

ICA est adaptée à des données biologiques car elle suppose que les données d'expression de gènes générés à partir de la technologie des puces à ADN sont une combinaison linéaire de certaines composantes indépendantes ayant interprétations biologiques spécifiques (Engreitz et al., 2010). Hori en 2001 (Hori and Inoue, 2001) et Liebermeister en 2002 (Liebermeister, 2002) ont montré que le modèle de l'ICA peut effectivement classer les expressions de gènes en groupes biologiquement cohérent et de les relier à des processus biologiques distincts. Aussi, ICA a largement été utilisée dans l'analyse de données de puces à ADN pour l'extraction de caractéristiques, le regroupement et la classification de l'analyse de la régulation des gènes. La littérature la plus riche sur l'utilisation de l'ICA pour les données transcriptomiques s'intéressent au cancer tels que: cancer de l'ovaire (Martoglio et al., 2002), le cancer du sein (Chiappetta et al., 2004, Teschendorff et al., 2007, Nicholson, 2007)], le cancer de l'endomètre (Saidi et al., 2004), du côlon et de la prostate (Zhang et al., 2005), et la leucémie myéloïde aiguë (Frigyesi et al., 2006).

#### **4. Les signatures comme biomarqueur**

Selon la définition proposée par le National Institute of Health (NIH), un biomarqueur est « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ». Le biomarqueur est le plus souvent une protéine, dosable dans le sang ou l'urine (Ilyin et al., 2004). Ce concept n'est pas nouveau puisque la glycémie, dosée dès 1848, est un biomarqueur reconnu tant pour caractériser le diabète que pour évaluer l'efficacité des molécules antidiabétiques.

La découverte de nouveaux biomarqueurs est étroitement liée au développement des nouvelles technologies. L'avènement de la transcriptomique a permis la production d'une quantité faramineuse de données qui pourraient être utilisées comme traceur dans le cadre de certaines pathologies par exemple. En effet, un nouveau champ nommé la vaccinologie des systèmes (Pulendran et al., 2010) est en plein essor. La vaccinologie des systèmes cherche à prédire le plus tôt possible la réponse immune déclenchée suite à une vaccination. *Gaucher et al.* du laboratoire de *Rafick-Pierre Sékaly* ont pu mettre en évidence une signature de la réponse immune au vaccin de la fièvre jaune dans une cohorte de 40 volontaires. L'algorithme ICA leur a permis de démontrer une up-régulation précoce de certains transcrits tels que IRF7, ETS2 et STAT1. (Gaucher et al., 2008).

*Querec et al* du laboratoire de *Bali Pulendran* ont également analysé la réponse immunitaire déclenchée en réponse au vaccin humain de la fièvre jaune et ont pu identifier une signature précoce permettant de prédire la magnitude de la réponse T CD8<sup>+</sup> potentielle au vaccin. La

signature générée est constituée d'une dizaine de gènes et permet de prédire la réponse immunitaire au vaccin à partir d'un échantillon de sang de patient (Querec et al., 2008).

Ces études sont des exemples de la force de l'intérêt des signatures moléculaires en tant que biomarqueurs.

### **III. Maths-Bioinformatiques-Biologie**

La validation de la cohérence biologique des signatures moléculaires générées est indispensable, pour ce faire une étroite collaboration entre des experts (biologistes, médecins ou autres), des bioinformaticiens, des statisticiens voire des mathématiciens semble nécessaire. En effet, des allers-retours permanents entre les informations issues des mathématiques et les connaissances issues de la bioinformatique et de la biologie pourraient améliorer ce genre d'outils.

## **Chapitre II. L'immunogénicité des tumeurs... un facteur crucial**

### **I. Immunogénicité des tumeurs**

L'immunogénicité, définie par la capacité d'induire une réponse immunitaire adaptative, a été largement abordée par les expériences de transplantation de cellules tumorales (Blankenstein et al., 2012). En effet, les cellules tumorales qui déclenchent un rejet dans des souris naïves syngéniques sont considérées comme étant fortement immunogènes. Or, si le rejet nécessite une immunisation au préalable, ces cellules sont considérées comme « à immunogénicité intermédiaire ». Enfin, le non rejet après immunisation classe les cellules concernées comme faiblement immunogènes. La faible immunogénicité des cellules tumorales a souvent été attribuée aux phénomènes d'immuno-sélection et d'immuno-subversion ayant lieu dans l'hôte porteur de tumeurs (Zitvogel et al., 2006). Cependant, les tumeurs sporadiques qui sont des tumeurs faiblement immunogènes progressent malgré la présence de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques des antigènes pouvant induire une protection à longue durée de vie grâce une vaccination prophylactique (Willimsky et al., 2008).

De plus, il est très fréquent d'observer une réponse adaptative à travers une sécrétion d'anticorps spécifiques des antigènes de cellules tumorales chez l'homme ainsi que chez la souris. En effet, des anticorps (IgG) spécifiques de plus de 2000 antigènes, presque tous des antigènes du soi souvent surexprimés par les cellules cancéreuses, ont été détectés au niveau du sérum de patients atteints de cancer (voir the Cancer Antigen Discovery Program). Ces antigènes ne déclenchent pas de rejet dans les modèles de transplantation chez la souris (Preiss et al., 2005). Des réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes tumoraux incluant une grande proportion d'antigènes du soi ont été détectées dans le microenvironnement tumoral et dans le sang de patients atteint de cancer (Lennerz et al., 2005). De plus, *Willimsky et al.* ont

démontré dans un modèle de tumeurs sporadiques chez la souris que l'expression d'un oncogène rare induisait une tolérance lors de la phase pré-maligne qui s'accompagnait d'une augmentation d'anticorps (IgG), une augmentation des cellules CD8<sup>+</sup> anergiques et une infiltration de cellules T au niveau du site tumoral. Des dysfonctionnements immunitaires ont été observés chez les souris porteuses de tumeurs immunogènes mais pas dans celles avec des tumeurs non-immunogènes, probablement à cause d'une stimulation antigénique chronique (Willimsky et al., 2008). Par conséquent, il semble que la plupart des tumeurs déclenchent des réponses adaptatives et sont donc immunogènes. Cependant, des questions restent en suspens: (i) *ces réponses induites sont-elles destructrices?* (ii) *Sous quelles conditions la tolérance immunitaire est-elle précédée par une réponse T destructrice (immuno-surveillance) ?*

L'analyse de l'infiltrat de cellules T dans les lésions pré-malignes par *Willimsky et al* indique que, chez les souris hôtes ayant déjà acquis un statut de tolérance immunitaire, l'inflammation chronique induite par les cellules tumorales n'est pas destructrice.

## **II. AB1 vs. B16... Un modèle, un profil d'expression**

L'immunogénicité tumorale varie grandement d'une part en fonction du type de cancer d'autre part en fonction des individus atteints d'un même type de cancer.

Nous avons généré des données transcriptomiques à partir de deux modèles de tumeurs, les cellules AB1, un modèle fortement immunogènes de mésothéliome (Davis et al., 1992) et les cellules B16, un modèle faiblement immunogène de mélanome.

Dans le modèle B16, nous avons mis en évidence au niveau du microenvironnement tumoral une inhibition précoce (dès jour 4 après injection de cellules tumorales) des voies de signalisation immunologiques, confirmant ainsi les précédents résultats du laboratoire à savoir une induction de tolérance à travers des cellules régulatrices (Darrasse-Jèze et al., 2009). L'une des explications possibles de cette induction de tolérance pourrait être la faible immunogénicité de ces cellules B16. En effet, on retrouve « la maturation des cellules dendritiques » parmi les voies fortement down-régulées. On peut imaginer que les cellules dendritiques présentes au niveau du site tumoral ne sont pas matures ce qui les rend tolérogéniques. Ces cellules dendritiques tolérogéniques vont faire appel – via la sécrétion de cytokines immunosuppressives – à d'autres populations régulatrices telles que les cellules Tregs et MDSC (Ghiringhelli et al., 2005).

Concernant le modèle AB1, nous avons utilisé des cellules tumorales AB1-HA (Marzo et al., 1999), cellules auxquelles a été ajouté un antigène dominant HA connu pour induire une forte réponse T cytotoxique (Watanabe et al., 2002). Au laboratoire, *Bergot et al* ont démontré une différence d'immunogénicité entre les cellules AB1 et AB1-HA (Bergot et al., 2010).

Grâce à l'analyse des données transcriptomiques, nous avons pu mettre en évidence dans ce modèle (AB1-HA) une modulation précoce (dès le Jour 2) des voies de signalisation immunitaires. L'analyse détaillée des signatures moléculaires a révélé que cette modulation concerne aussi bien les voies effectrices que régulatrices du système immunitaire (Figure 56). Ces observations ont ensuite été validées par l'étude des souris STAT1-KO. En effet, les souris invalidées pour le gène STAT1, essentiel à la voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$ , développent des tumeurs plus rapidement que les souris sauvages. Ces résultats confirment ce qui a été observé par **Kaplan et al** qui ont mis en évidence dans des souris traitées au MCA, une plus grande croissance tumorale, en absence d'IFN- $\gamma$  (Kaplan et al., 1998). Alors que le versant régulateur de la réponse immune est souvent, voire toujours, négligé en immunologie anti-tumorale, nous avons donc pu mettre en évidence, dans ce modèle fortement immunogène, une activation précoce du bras régulateur du système immunitaire. Les Tregs jouent un rôle crucial dans cette régulation négative, leur déplétion induisant un rejet de la tumeur dans 100% des souris (Figure 44).

De plus, l'analyse détaillée du module des signatures immunologiques a révélé l'up-régulation de plusieurs signatures régulant négativement le système immunitaire parmi lesquelles *negative regulation of response to stimulus*, *negative regulation of immune effector process* mais aussi *negative regulation of adaptive immune response*.

Ces signatures comprennent des gènes connus pour intervenir dans la régulation négative du système immunitaire tels que la chaîne alpha du récepteur de l'IL2 (CD25), Foxp3 ou encore IL10, CTLA4, CD44. La Figure 57 décrit l'annotation fonctionnelle d'une signature régulatrice parmi celles up-régulée au niveau du microenvironnement AB1 à Jour 4, on constate que la majorité des gènes composant cette signature sont reliés à la fonction régulatrice du système immunitaire, parmi lesquels les marqueurs des cellules Tregs (Foxp3, CD25, CTLA4).

Les profils d'expression génique différents obtenus entre les deux modèles (AB1, B16) ne sont pas étonnants si l'on considère d'une part la différence d'immunogénicité des tumeurs mais également le fond génétique des souris (BLAB/C pour le modèle AB1 et C57Bl/6 pour le modèle B16). Aussi, on peut penser que chaque modèle tumoral met en place une stratégie propre afin échapper au système immunitaire.

Le modèle parfait n'existe pas et tous ne reflètent pas ce qui se passe dans les cellules tumorales humaines qui sont spontanées et peu immunogènes. Ici, nous pouvons raisonnablement penser que les cellules tumorales humaines se rapprocheraient plus d'un modèle B16 que d'un modèle AB1-HA.

En définitive, les données transcriptomiques confirment les résultats obtenus précédemment



cellulaires. Parmi ces mécanismes, la sous-expression ou la perte de CMH de type I qui réduit l'immunogénicité qui est fréquemment observée chez l'Homme (Garrido et al., 2010). Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) contribuent grandement à la réussite ou l'échec du déclenchement d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Les mécanismes d'immunosuppression à travers différentes populations de cellules régulatrices (Tregs, macrophages régulateurs, cellules dendritiques) influent sensiblement sur l'immunogénicité des cellules tumorales en déclenchant des signaux inhibiteurs ou en sécrétant des cytokines qui vont moduler l'immunogénicité des tumeurs afin de « protéger » les tumeurs (Jungbluth et al., 2002).

Afin de mettre en évidence le lien étroit entre l'immunogénicité des cellules tumorales et les cellules régulatrices, une étude réalisée au laboratoire par *Bergot et al*, et résumée dans la Figure 58, a montré que chaque modèle tumoral réagit différemment face à l'élimination des cellules Tregs. En effet, l'élimination des cellules Tregs par anticorps anti-CD25, le PC61, permet un rejet de tumeur dans le modèle AB1 (-HA) ou 4T1 (-HA). Or, le rejet de la tumeur est dépendant la qualité de l'antigène exposé par les cellules tumorales. Le taux de rejet dans le modèle 4T1 est de 60% alors que dans le modèle 4T1-HA (plus immunogène) il est de plus de 80%. Dans le modèle B16, la déplétion des cellules Tregs ne permet pas un rejet total des cellules tumorales mais seulement un retard de croissance par rapport aux souris non déplétées, ce phénomène a déjà été décrit par plusieurs équipes (Darrasse-Jèze et al., 2009; (Sutmuller et al., 2001). Ces observations peuvent être expliquées de plusieurs façons notamment par un manque d'efficacité de la déplétion anti-CD25 qui ne permet pas une déplétion totale des cellules Tregs. De plus, il n'est pas impossible que d'autres cellules suppressives aient un rôle important dans le phénomène de tolérance, les cellules MDSC semblent être un candidat sérieux à ne pas négliger. En effet, nous avons observé dans nos modèles de tumeurs B16 une augmentation de ces cellules [Article en préparation].

Cette étude illustre parfaitement le fait que l'immunogénicité des cellules tumorales influe sur le profil génique et moléculaire présent au microenvironnement tumoral, expliquant en partie les différences de profils transcriptomiques des microenvironnements tumoraux B16 et AB1 que nous avons observé.

1 <sup>ère</sup> injection	PC61	% de rejet	2 <sup>ème</sup> injection	% de rejet
AB1-HA	-	0 (n=8)		
AB1	-	0 (n=8)		
4T1HA	-	0 (n=8)		
4T1	-	0 (n=8)		
AB1-HA	+	83.3 (n=12)		
AB1	+	16.7 (n=12)		
4T1HA	+	ND		
4T1	+	60 (n=10)		
AB1-HA	+		AB1-HA	100 (n=6)
AB1-HA	+		AB1	66 (n=3)
AB1-HA	+		4T1HA	33 (n=3)
AB1-HA	+		4T1	16.7 (n=6)
AB1	+		4T1	100 (n=3)

**Figure 58. Taux de rejet de tumeurs suite à une élimination de cellules Tregs dans différents modèles tumoraux.**

ND= non déterminé. Résultats représentatifs de 5 expériences

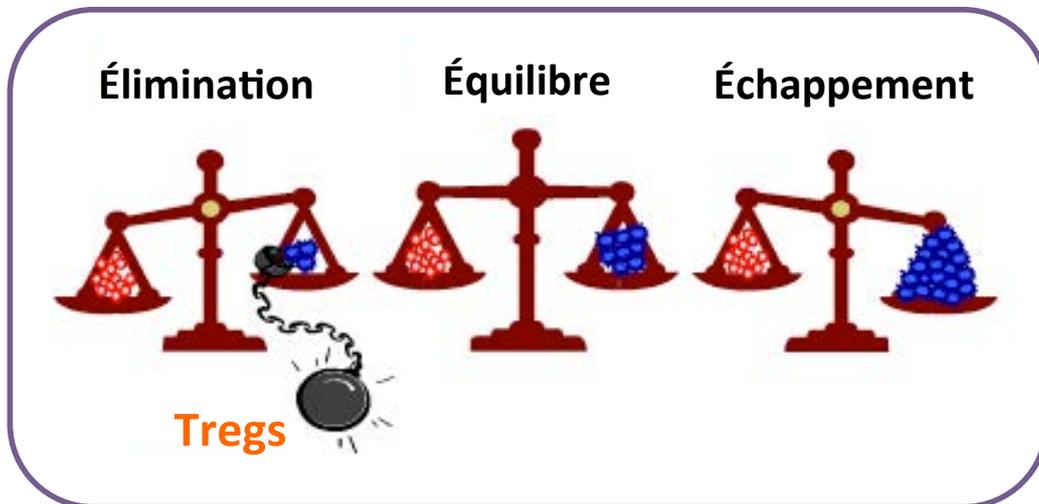
*Figure adaptée de (Bergot et al., 2010).*

#### IV. La théorie des 3E (immuno-édition) revisitée

A l'origine, la théorie de l'immunosurveillance de *MacFarlane Burnet* était basée sur la capacité du système immunitaire à distinguer le soi du non soi : la question essentielle était de savoir si les cellules cancéreuses d'origine non virales étaient perçues par le système immunitaire comme faisant partie du soi ou bien du non soi. Initialement, on pensait que les cellules du soi étaient tout simplement ignorées par le système immunitaire et que par un processus de transformation des cellules « saines » elles devenaient des cellules du non-soi reconnaissables par le système immunitaire (Klein and Klein, 1977). Cependant, il a été démontré depuis que les cellules tumorales expriment des antigènes du soi qui sont reconnus par le système immunitaire via les cellules Tregs. Ces Tregs, en reconnaissant ces antigènes du soi, vont protéger les cellules tumorales comme elles le feraient pour n'importe quel tissu normal de l'organisme. L'immunosurveillance s'avère donc surtout médiée par les cellules régulatrices et non pas seulement par les cellules Teffs.

Sans remettre complètement en cause la théorie de l'immuno-édition (théorie des 3 E) proposée par *Robert Schreiber* (Dunn et al., 2004a), nous pensons, au vu de nos résultats, que les cellules régulatrices (Tregs) font partie intégrante de cette théorie, car ce sont les premières cellules à être alertées et activées en présence de cellules tumorales (Figure 59). De plus, de nombreuses populations cellulaires, comme les cellules T CD4 et les CD8  $\alpha\beta$ , les cellules B, les macrophages, les cellules dendritiques, NK et NKT sont impliquées dans la

réponse anti-tumorale (Zitvogel et al., 2006). Or, toutes ces cellules sont connues pour être des cibles de cellules Tregs.



**Figure 59. La théorie des 3E (immuno-édition) revisitée.**

Lors de la phase d'élimination qui concerne plusieurs types cellulaires de l'immunité innée et adaptative, les cellules régulatrices (Tregs) sont les premières à être activées au niveau du microenvironnement tumoral (Darrasse-Jèze et al., 2009). Ces cellules Tregs sont responsables de l'instauration d'un environnement tolérogène qui va avoir pour conséquence de faire la pencher la balance en faveur de l'échappement.

## Chapitre III. Immunothérapies & cancer

L'objectif ultime de nos travaux est de mettre en évidence des molécules ou des voies de signalisation jouant un rôle crucial dans la réponse immunitaire anti-tumoral et qui, une fois connues, pourraient servir de cibles thérapeutiques. Diverses molécules pourront être développées (anticorps, drogues..) afin de les stimuler ou bloquer ces molécules ou voies signalisation.

Dans ce chapitre, je vais introduire brièvement les immunothérapies qui ont été mises en place. Ensuite, je vais discuter les résultats obtenus avec les trois types de tumeurs B16 (B16-WT, B16-TGF et B16-VEGF). Aussi, je discuterai le rôle que jouent les cellules T régulatrices (Tregs) dans les immunothérapies et les potentiels effets délétères de ces thérapies. Je finirai par discuter la place de l'immunologie des systèmes au sein des immunothérapies.

### I. Immunothérapies du cancer

Depuis les années 1950, de nombreux essais cliniques ont été mis en place afin de trouver un traitement anti-tumoral efficace, en vain. Et cela malgré les progrès techniques et l'accumulation des données montrant une forte corrélation entre la modulation du système immunitaire et le cancer.

#### 1. Immunothérapie non spécifique

L'immunothérapie non spécifique est la plus ancienne des immunothérapies. Elle a été décrite pour la première fois à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par *William B. Coley*, qui est considéré comme étant le «père de l'immunothérapie du cancer». En effet, il fut l'un des premiers à comprendre que le combat contre le cancer ne peut être gagné qu'avec l'aide d'un système immunitaire efficacement activé.

Dans cette lancée, le vaccin Bacille Calmette Guerin (BCG) a été développé pour le traitement du cancer de la vessie avec un certain succès (Hortobagyi et al., 1979). Aujourd'hui, l'immunothérapie classique administre des cytokines et/ou des chimiokines afin de traiter le cancer. Ces molécules sont injectées dans le but d'amplifier la réponse immunitaire anti-tumorale, qui passe par une stimulation des fonctions cytotoxiques des lymphocytes contre les cellules tumorales (Homey et al., 2002; Dranoff, 2005).

#### 2. Immunothérapie passive

Les immunothérapies passives reposent sur l'injection d'anticorps monoclonaux à la place des cytokines. L'objectif étant d'induire une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des

anticorps (antibody-dependent cellular cytotoxicity ou ADCC), d'améliorer ou au contraire de réduire au silence la réponse immunitaire. Par exemple, *Melero, Hervas-Stubbs et al* ont mis en évidence que des anticorps monoclonaux anti-CD28 augmentaient la costimulation alors que les anti-CTLA-4 l'inhibaient (Melero et al., 2007).

L'injection d'anticorps reconnaissant les antigènes tumoraux est aussi utilisée afin de stimuler une mort cellulaire induite par les anticorps (antibody induced cell death ou AICD) à travers l'opsonisation et les cascades du complément ou bien à travers la lyse par les cellules NK (Weiner and Adams, 2000).

### 3. Immunothérapie active

Depuis la découverte des antigènes associés aux tumeurs en 1991 par le professeur *Thierry Boon*, (van der Bruggen et al., 1991), l'immunothérapie contre le cancer a connu de nouvelles perspectives. Les approches d'immunisation active sont basées sur l'injection des cellules mortes, de protéines/peptides ou encore de cellules dendritiques chargées de peptides. L'hypothèse qui sous-tend l'immunothérapie active repose sur l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale ou bien de délivrer les molécules/cytokines au niveau du site tumoral (Banchereau and Palucka, 2005).

Habituellement, les vaccins se proposent d'améliorer directement la réponse CTL, or les cellules T auxiliaires CD4<sup>+</sup> pourraient être ciblées. Leur rôle dans la destruction directe des cellules tumorales, leur capacité de présentation croisée d'antigènes tumoraux et leur fonction « d'aide » dans la maturation des CTL pourrait maximiser la réponse anti-tumorale (Knutson and Disis, 2005). *Chaput et al* ont en effet montré que les cellules T CD8<sup>+</sup> réponse sont altérées dans la tumeur en l'absence des cellules T auxiliaires CD4<sup>+</sup> (Chaput et al., 2007).

### 4. Thérapie cellulaire adoptive (ACT)

Individuellement chacune des thérapies décrites précédemment peut connaître un succès, notamment, les vaccins à base de cellules dendritiques. Or, le taux de réponse effective demeure relativement faible (<3%), ceci est dû en partie au fait que les mécanismes immunosuppresseurs ont été longtemps négligés (Rosenberg et al., 2004). Cependant, des lueurs d'espoirs basées sur la thérapie cellulaire adoptive (ACT) émergent.

L'ACT repose sur l'utilisation des lymphocytes T issues de patients atteints de cancer et qui sont dotés de propriétés anti-tumorales. Ces cellules sont amplifiées *in vitro* pour être réinjecter aux patients.

## 5. Immunothérapies combinatoires

Tout bien considéré, la combinaison des thérapies pourrait améliorer l'efficacité des traitements. L'objectif des thérapies combinatoires est de moduler des voies de signalisation distinctes en touchant à des mécanismes complémentaires.

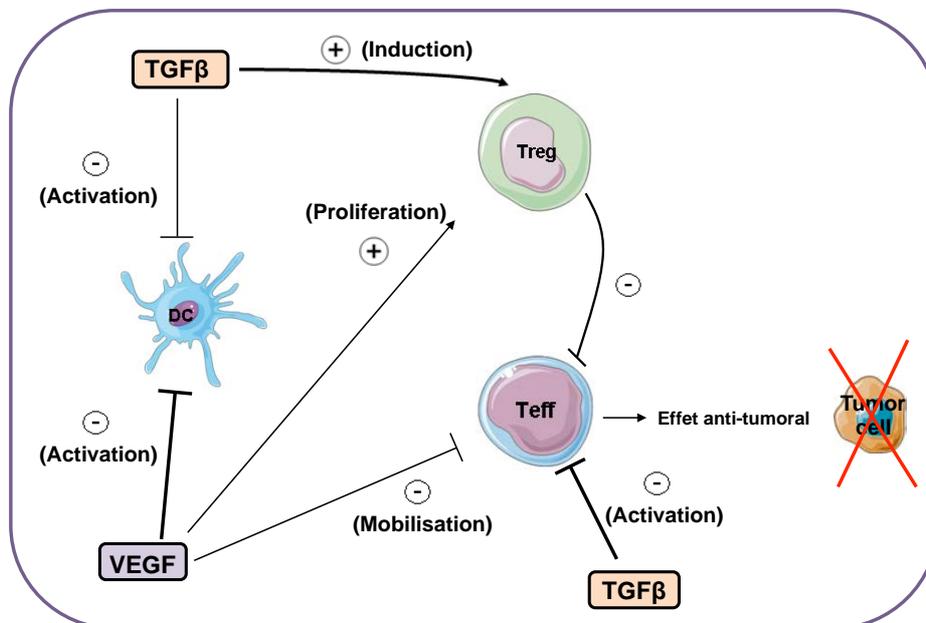
Plusieurs études chez la souris ont mis en évidence que les vaccins combinant des cellules tumorales irradiées exprimant le facteur de croissance GM-CSF et des traitements anti-CTLA-4 + anti-CD25 permettent le rejet total des cellules tumorales faiblement immunogéniques B16 (van Elsas et al., 1999; Suttmuller et al., 2001).

De plus, les résultats que nous avons obtenus, à savoir des profils d'expression dépendants du modèle tumoral utilisé, plaident en faveur d'une immunothérapie concernant plusieurs voies de signalisation impliquées dans la réponse anti-tumorale.

Forts de nos résultats et de ceux d'autres équipes, et persuadés qu'une thérapie ciblant à la fois les cellules effectrices et les cellules régulatrices sera plus efficace qu'une thérapie ciblant une de ces deux populations, nous avons généré des tumeurs invalidées pour deux molécules cruciales pour la réponse anti-immunitaire (le VEGF et le TGF $\beta$ ).

### a. Pourquoi éteindre le TGF $\beta$ et VEGF ?

De nombreuses études ont mis en évidence que les cellules tumorales (Liu et al., 2007), ainsi que les cellules du microenvironnement tumoral (Larmonier et al., 2007) produisent des molécules immunosuppressives telles que le VEGF, TGF $\beta$ , ou encore l'IL10 afin de contrecarrer la réponse effectrice de l'hôte. Le choix de ces deux molécules a été motivé par leur rôle majeur au niveau du microenvironnement, permettant de contrôler et d'organiser les réponses immunitaires anti-tumorales (Figure 60). Ces deux molécules agissent directement ou indirectement sur différentes populations cellulaires (cellules dendritiques, cellules régulatrices et cellules effectrices). En effet, il a été montré que la production de VEGF par les cellules tumorales humaines inhibe la maturation des cellules dendritiques (Gabilovich et al., 1996). De plus, le VEGF permet la stimulation de la prolifération des Tregs (Terme et al., 2013). Le TGF $\beta$  quant à lui, en agissant sur la conversion des cellules CD4<sup>+</sup> naïves en cellules Tregs (Chen et al., 2003), va induire un environnement tolérogène «protecteur des cellules tumorales». Il agit par ailleurs sur la maturation des cellules dendritiques, en favorisant leur maintien dans un état immature, ce qui va déclencher la prolifération des Tregs (Wada et al., 2009, Belkaid and Oldenhove, 2008).



**Figure 60. Rôle du TGFβ et du VEGF dans l'immunité anti-tumorale.**

### **b. Un retard de croissance T-dépendant ?**

Le retard de croissance, représenté sur la Figure 28, entre les tumeurs WT et les tumeurs invalidées (pour le VEGF ou pour le TGFβ) est dépendant des cellules T. En effet, la croissance tumorale dans un contexte CD3-KO n'est pas altérée dans les tumeurs invalidées en comparaison avec les tumeurs B16-WT [article en préparation]. Ces observations confortent nos résultats obtenus par transcriptomique puisque, même si les profils d'expression des microenvironnements tumoraux «shVEGF» ou «shTGFβ» sont différents (Figure 30), les deux lignées invalidées induisent un retard de croissance significatif (en comparaison avec la lignée B16-WT). Cela traduit la mise en place d'une réponse immunitaire T anti-tumorale différente.

En effet, l'invalidation du TGFβ permet une up-régulation précoce (à jour 4) de divers gènes impliqués dans les voies de signalisation d'ICOS-ICOSL, CD28, CCR5 au niveau des macrophages, du CTLA4, d'OX40 ainsi que de la voie de signalisation du TCR. Ceci indique une implication des molécules de co-stimulation dans le rejet des tumeurs «sh-TGFβ». Ces résultats démontrent donc une modulation précoce du système immunitaire et mettent clairement en évidence le rôle du TGFβ dans le maintien des cellules tumorales alors même que plusieurs études lui attribue un rôle de suppresseur de la tumeur par une régulation négative du cycle cellulaire des cellules tumorales (Kang et al., 2003), (Isoe et al., 1998). De nombreuses études décrivent l'implication de ces voies de signalisation dans la réponse anti-tumorale. En effet, *Fu et al* ont mis en évidence que la voie de signalisation ICOS-ICOS-L est requise pour une réponse anti-tumorale optimale induite par la thérapie anti-CTLA-4 (Fu

et al., 2011). De plus, le CCR5 est décrit comme étant une molécule régulant positivement la réponse T anti-tumorale (González-Martín et al, 2011). Cependant, d'autres études lui décrivent un rôle régulateur puisque les souris CCR5<sup>-/-</sup> retardent le développement de la tumeur (Lee et al., 2012). Par ailleurs, l'utilisation d'un agoniste d'OX40 a mis en évidence une régression tumorale chez des patients atteints de cancer (en phase avancée) (Curti et al., 2013).

L'inactivation de VEGF déclenche à jour 4 une réponse cytokinique, une augmentation de la production de L'IL17 et une inhibition des métallo-protéases (MMP6, MMP9). L'augmentation de la production de l'IL17 en réponse à un traitement anti-VEGF a été décrite comme une réaction de résistance aux traitements anti-VEGF (Maniati and Hagemann, 2013). En effet, le blocage de l'IL17 rend les tumeurs plus réceptives à la thérapie anti-VEGF (Chung et al., 2013). De plus, lorsque l'on s'intéresse à la voie de l'IFN- $\gamma$  (à jour 4 ou jour 14), on constate que cette voie est globalement inhibée dans les tumeurs WT et activée dans les tumeurs invalidées (Figure 24). Cela témoigne d'une implication de l'IFN- $\gamma$  dans le retard de croissance des lignées invalidées.

Dans le microenvironnement des tumeurs shVEGF, à jour 14, on constate une persistance de la voie de signalisation de l'IL17 et l'apparition de nouvelles voies (en comparaison aux tumeurs à J4) telles que la présentation antigénique ou encore communication entre immunité innée et adaptative. De plus, on constate une forte up-régulation de la voie d'IFN- $\gamma$  et des granulocytes. Ceci témoigne de l'installation de la réponse immunitaire anti-tumorale via la sécrétion de molécules anti-tumorales. Néanmoins, l'IL17 a été décrit pour induire une tolérance plutôt qu'une réponse effectrice (Honorati et al., 2006), (Numasaki et al., 2003).

Dans le microenvironnement des tumeurs shTGF $\beta$ , toujours à jour 14, la voie de l'IFN- $\gamma$  est également fortement up-régulée et on observe aussi une modulation des voies des cellules granulocytes et du VEGF. Cependant, on ne retrouve plus les voies CTLA4, OX40 et ICOS-ICOSL voies (en comparaison à J4) qui semblent agir rapidement après la mise en place de la tumeur. Par ailleurs, nous avons observé une diminution du recrutement des cellules Tregs dans les ganglions des souris injectées avec les tumeurs B16 invalidées en comparaison avec les souris injectées avec les tumeurs B16-WT. Aussi, au niveau du microenvironnement tumoral, nous observons la diminution drastique d'une autre sous-population suppressive, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) chez les souris injectées avec les tumeurs B16 invalidées en comparaison avec les souris injectées avec les tumeurs B16-WT [article en préparation] - Ces résultats font l'objet d'une thèse au laboratoire.

Des effets similaires à ces résultats - à savoir que l'inactivation du VEGF déclenche une diminution des populations suppressives - ont été décrits par plusieurs groupes. En effet, dans

un modèle murin de cancer du côlon, *Ozao-choy et al* ont traité les souris avec un inhibiteur ciblant le récepteur du récepteur VEGF (le *sunitinib*) et ont décrit une diminution des cellules Tregs et des MDSCs tant au niveau systémique qu'au niveau du microenvironnement tumoral. Cela a eu pour effet l'augmentation des cellules T sécrétrices d'IFN- $\gamma$  mais une diminution de l'expression de CTLA4, PD1, PDL1. (Ozao-Choy et al., 2009). Ces travaux ont été confirmés chez l'homme par plusieurs équipes (Finke et al., 2008), (Ko et al., 2009), (Adotevi et al., 2010).

Ces résultats montrent, qu'aux temps précoces après injection des cellules tumorales, des profils d'expression mettant en exergue des mécanismes complètement distincts conduisent au même retard de croissance des tumeurs invalidées.

### c. Le basculement Down $\rightarrow$ Up

En utilisant une approche supervisée (analyse des GDE) et non supervisée (génération des signatures moléculaires), nous avons mis en évidence que l'invalidation de l'expression d'un gène au sein de la tumeur B16-WT (VEGF ou TGF $\beta$ ) est suffisant pour induire un retard de croissance accompagné par un basculement Down  $\rightarrow$  Up des voies de signalisation immunologiques (Figure 36).

L'analyse des signatures moléculaires a confirmé ce basculement mis en évidence en analysant les GDE issues de chaque condition. En effet, comme le démontre la Figure 36, on observe un fort enrichissement des voies immunologiques dans les signatures down-régulés B16-WT et up régulés shVEGF et shTGF $\beta$ .

Ce basculement Down  $\rightarrow$  Up coïncide avec une baisse des Tregs infiltrant le site tumoral B16-shTGF $\beta$  par rapport à B16-WT [article en préparation] et vient clairement confirmer ce que nous avons observé auparavant, à savoir une induction de tolérance dans le microenvironnement B16-WT.

La présence moins importante des Tregs au niveau du microenvironnement des tumeurs invalidées, va se traduire par une levée de la tolérance instaurée pour permettre aux cellules effectrices de rejeter les tumeurs via l'up-régulation entre autres des voies de l'IFN- $\gamma$ . Des résultats préliminaires du laboratoire permettent de mettre en évidence une augmentation de la prolifération des cellules T effectrices au niveau du microenvironnement B16-shTGF $\beta$ , B16-shVEGF par rapport au microenvironnement B16-WT.

Ces observations mettent en exergue un rôle crucial des cellules régulatrices responsables de l'instauration d'un microenvironnement qui protège les cellules tumorales puisque les deux gènes invalidés et impliqués dans ce basculement Down  $\rightarrow$  Up sont des gènes impliqués dans l'induction des cellules régulatrice (Terme et al., 2013, Alshaker and Matalka, 2011).

## II. Immunothérapies ciblant les Tregs

Il devient de plus en plus évident que les cellules Tregs jouent un rôle primordial dans l'immuno-surveillance des cellules tumorales. En effet, chez les patients atteints de cancer, il existe une corrélation négative entre l'abondance des Treg et la survie (Curiel et al., 2004). De plus, dans le laboratoire, plusieurs études nous ont permis de définir les Tregs comme étant les cellules clés de l'immunité anti-tumorale (Bergot et al., 2010).

### 1. Comment supprimer les cellules suppressives ?

On peut raisonnablement penser que pour permettre aux cellules effectrices de détruire les cellules tumorales, il faut éliminer ces cellules Tregs qui protègent en quelque sorte les tumeurs. Par conséquent, la question qui mérite d'être posée est : « *comment contrecarrer les cellules T régulatrices afin d'optimiser les traitements du cancer ?* »

#### a. Eliminer « physiquement » les Tregs

De nombreuses études ont montré que la déplétion *in vivo* des cellules Treg CD25<sup>+</sup> permet l'amélioration de la réponse anti-tumorale. (Onizuka et al., 1999 ; Shimizu et al., 1999; Suttmuller et al., 2001; Chen et al., 2005; Ghiringhelli et al., 2005).

Dans le modèle AB1, l'élimination des cellules Tregs a induit un rejet total des cellules tumorales chez 100% des souris (Figure 44). Nous avons obtenu le même type de résultats en utilisant un autre modèle tumoral d'adénocarcinome mammaire (4T1). Cependant, comme discuté précédemment, la déplétion des Tregs ne permet pas le rejet des tumeurs dans tous les modèles puisque dans le modèle B16-WT cela n'induit qu'un retard de croissance.

#### b. Supprimer la suppression

Il existe plusieurs manières de supprimer la suppression due à l'action des cellules Tregs. En effet, il a été montré, chez la souris et chez l'Homme, qu'un signal TCR fort (via un anticorps anti-CD3) et une forte dose d'anti-CD28 induisent une résistance des cellules T effectrices à la suppression due aux Tregs *in vitro*. A contrario, un faible signal TCR favorise la stimulation des Tregs (Thornton and Shevach, 1998); (Baecher-Allan et al., 2002).

**Thornton and Shevach et al** ont mis évidence que l'addition d'IL-2 dans la culture de Tregs et Tregs permet de contrer l'activité suppressive des Tregs (Thornton and Shevach, 1998) et que l'administration locale d'IL12 réduit considérablement la suppression des Tregs dans les tumeurs (Kilinc et al., 2006).

Récemment l'*ipilimumab*, un anticorps anti-CTLA-4, a obtenu une autorisation de mise sur le marché et utilisé en clinique. Les résultats prometteurs (Robert et al., 2011) (Hodi et al., 2010)

obtenus grâce à l'utilisation de cet anticorps démontre tout l'intérêt de la considération du bras régulateur de la réponse immunitaire.

### **III. Les effets potentiellement délétères des immunothérapies**

#### **1. Rupture de tolérance**

Partant du principe que les cellules tumorales ne sont pas des cellules étrangères mais bien au contraire des cellules du soi, toutes tentatives de manipulation de système immunitaire ayant pour objectif leur reconnaissance, voire leur destruction, va devoir se confronter au problème de rupture de tolérance.

La tolérance du soi est définie comme la capacité des cellules T dotées d'un TCR à répondre aux antigènes du soi qui sont présentés sous certaines conditions de stimulations. La rupture de tolérance au soi peut avoir pour conséquence l'apparition d'auto-immunité ce qui peut prendre une tournure plus ou moins dramatique pour l'organisme. En effet, la perte de pigmentation de la peau, ou vitiligo qui est une manifestation auto-immunitaire, a été constatée dans plusieurs études comme dommage collatéral des traitements anti-tumoraux chez la souris ainsi que chez l'humain (van Elsas et al., 1999 ; Overwijk et al., 1999 ; Overwijk and Restifo, 2000 ; Suttmuller et al., 2001).

#### **2. Propagation de déterminants antigéniques**

La propagation des déterminants est un processus dans lequel des déterminants antigéniques, distincts et non cross-réactifs avec un déterminant d'induction, deviennent des cibles supplémentaires d'une réponse immunitaire. La première description de propagation d'épitopes a été réalisée par *Lehmann et al* dans les modèles de auto-immunité EAE (Lehmann et al., 1992; McRae et al., 1995) ainsi que dans les modèles de souris diabétiques NOD (Kaufman et al., 1993). Le phénomène de propagation d'épitopes a ensuite été relaté dans l'arthrite, la myasthénie grave et viro-induite la sclérose en plaques (Vanderlugt and Miller, 2002) et enfin, dans des modèles de cancer chez la souris (el-Shami et al., 1999; Markiewicz et al., 2001).

Chez l'humain, la majorité des patients atteints de divers cancers et répondant à une immunothérapie (en général vaccins de cellules dendritiques) affichent une réactivité à d'autres peptides que ceux utilisés pour la vaccination (Ribas et al., 2003; Wierceky et al., 2006). La corrélation entre la réponse clinique et la propagation de déterminants antigéniques suggère que la diversité immunitaire pourrait représenter un objectif important permettant d'améliorer les traitements du cancer. Une plus large réponse anti-tumorale T pourrait promouvoir l'élimination de cellules variantes d'antigènes tumoraux « négatives », var<sup>Neg</sup>. (el-

Shami et al., 1999; Markiewicz et al., 2001). De plus, *Bergot et al* ont mis évidence que l'expression d'un épitope immunodominant peut biaiser la réponse immunitaire et, par conséquent, empêcher le développement d'une réponse plus forte due à d'autres antigènes tumoraux (Bergot et al., 2010).

#### **IV. La contribution de l'Immunologie des systèmes dans les immunothérapies**

Les immunothérapies combinées semblent être plus efficaces que celles basées sur une seule molécule (Vanneman and Dranoff, 2012).

Cette constatation est un des arguments en faveur de l'approche systémique pour la mise en évidence de molécules cibles, utilisables en thérapies anti-cancer. L'immunologie des systèmes permet d'apprécier l'état du système dans sa globalité et donc elle prend en compte les mécanismes de régulations complexes intervenant dans la réponse immune anti-tumorale. Aujourd'hui, l'utilisation de l'approche systémique à des fins thérapeutiques est monnaie courante. En effet, cette approche a permis l'établissement de biomarqueurs moléculaires en recherche clinique (signatures moléculaires) à partir d'analyse transcriptomique de tissus tumoraux (Bittner et al., 2000 ; Alizadeh et al., 2000) ou d'échantillons sanguins (Cobb et al., 2005; Allantaz et al., 2007).

Parmi ces études, celle de *Damien Chaussabel et al* a mené l'identification de modules se basant sur les profils d'expression des transcrits extraits à partir d'échantillons sanguins. Ces modules ont été utilisés par la suite pour la sélection de biomarqueurs spécifiques des stades d'avancement de la maladie chez des patients atteints de lupus systémique érythémateux (SLE). Ces modules sont disponibles en ligne et peuvent être testées sur n'importe quel jeu de données transcriptomiques (via GSEA par exemple).

Finalement nos résultats viennent compléter la liste de ces études. En effet, grâce à l'utilisation d'une stratégie s'appuyant sur une approche systémique, nous avons pu mettre en évidence (i) une inhibition des voies de signalisation immunologiques au niveau du microenvironnement tumoral et (ii) que l'invalidation d'un gène au niveau de la tumeur permet de faire basculer cette inhibition en activation (basculement Down → UP). Ainsi, nous avons pu décrire les mécanismes par lesquels la croissance tumorale des tumeurs invalidées est retardée. Ce genre d'observations n'aurait pas été possible par une approche réductionniste.

## **Chapitre IV. Fœtus, cellules tumorales... même combat ?**

### **I. Comparer une tumeur à un fœtus...socialement choquant mais biologiquement factuel**

Comparer un fœtus à une tumeur et une grossesse à un cancer est probablement maladroit et sociologiquement choquant. Lorsque l'on me demande : « quel est ton sujet de thèse ? » et que j'explique que je compare « ce qui protège la tumeur à ce qui protège le fœtus », la première réaction que je perçois est une réaction d'étonnement, voire de gêne. Le fait est que le système immunitaire ne rejette ni le fœtus, ni les cellules tumorales, bien que les deux soient composés d'un mélange d'antigènes du soi et du non soi. La comparaison est par conséquent légitime et pourra nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation complexes mis en place. De plus, notre laboratoire, qui porte un intérêt particulier pour les cellules Tregs, a mis en évidence depuis plus de dix ans une association forte entre ces cellules Tregs et la tolérance fœto-maternelle d'une part et la protection des cellules tumorales d'autre part (Darrasse-Jèze et al., 2009; Chen et al., 2013).

#### **1. Des voies de signalisation en commun**

Grossesse et cancer peuvent être comparables à bien des égards. Dans un cas, nous sommes en présence de cellules trophoblastiques hautement prolifératives et dans l'autre de cellules tumorales qui migrent pour pénétrer à travers le stroma afin de créer leur propre niche nutritive (riche en vaisseaux et en produits nutritifs). Dans les deux cas, ces cellules réussissent à échapper à l'apoptose, déclenchent un microenvironnement tolérogénique et pour couronner le tout, elles mettent en place un ensemble de stratégies d'évasion immunitaire ayant pour objectif de créer un site immunitaire privilégié. Ces caractéristiques communes sont résumées dans la Figure 6. Afin d'approfondir les connaissances concernant ces deux environnements, nous nous sommes intéressés à la comparaison des données transcriptomiques de l'interface fœto-maternelle à celles des données du microenvironnement tumoral du modèle B16.

##### **a. Des gènes en commun**

Aussi bien au niveau de l'interface fœto-maternelle qu'au niveau du microenvironnement tumoral, l'extraction supervisée des GDE et leur annotation nous ont révélé une down-régulation de la majorité des voies de signalisation immunitaires statistiquement significatives (Figure 46).

Maturation des cellules dendritiques et présentation antigénique : Nous avons constaté que les voies les plus fortement down-régulées dans les deux cas sont la voie de « *présentation antigénique* » et la voie de « *maturation des cellules dendritique* ». L'inhibition de ces deux voies - qui sont liées entre elles - au niveau de l'IFM peut être associée à une induction de tolérance via les cellules dendritiques immatures (Hackstein et al., 2001), (Menges et al., 2002); les cellules dendritiques matures pouvant quant à elles induire une tolérance (Akbari et al., 2001). Par ailleurs, **Clark et al** ont mis en évidence, chez la souris, que le blocage de CD200 - un marqueur des cellules dendritiques immature (Clark et al., 2003) - augmente significativement le taux de rejet de fœtus (Chaouat et al., 1995). De plus l'activation de CD200 sur les DCs a été décrite pour induire une population de cellules CD4<sup>+</sup>IL2RA<sup>+</sup> Tregs (Gorczyński et al., 2005).

Interférons : Le rôle des interférons, notamment l'IFN- $\gamma$ , dans la réponse anti-tumorale n'est plus à prouver (Kaplan et al., 1998) et nous avons montré que les souris STAT1-KO développent des tumeurs plus rapidement que les souris sauvages (Figure 28) [article en préparation]. Cela étant dit, des études mettent en évidence un potentiel rôle pro-tumoral de l'IFN-  $\gamma$  (Beatty and Paterson, 2000), (Morel et al., 2000). C'est ce que **Zaidi et al** appellent « le double visage de l'IFN- $\gamma$  dans la réponse anti-tumorale ». (Zaidi and Merlino, 2011)

TIM-3 : Un gène nommé HAVCR2 qui code une protéine TIM-3 est massivement up-régulé au niveau des deux microenvironnements (sauf à E4). Ce gène joue un rôle important dans la régulation des cellules innées afin d'induire une tolérance au niveau de l'IFM et du microenvironnement tumoral (Anderson, 2007) et régule négativement la réponse Th1 (Zhu et al., 2005) . En effet, l'utilisation d'anticorps anti-TIM-3 conduit à une augmentation de taux d'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  et un rejet du fœtus (Chabtini et al., 2013).

Aussi, au niveau du microenvironnement tumoral de la même manière que dans l'interface fœto-maternelle, nous observons une inhibition des voies de signalisation immunologiques à Jour 4 et à Jour 14 (Figure 21).

Granulocytes : Parmi les voies les plus significativement modulées à jour 4, on retrouve une voie qui s'appelle « *Granulocyte Adhesion and Diapedesis* », elle contient les gènes suivants : FN1, MMP3, MYH8, CXCL12, PF4, MYL4, MMP2, CXCL2. Cette voie est aussi modulée au niveau de l'interface fœto-maternelle à E6 où on y retrouve sensiblement les mêmes gènes. Une étude récente mis en évidence une augmentation des cellules suppressives dérivées des granulocytes myéloïdes (GR-MDSC) pendant la grossesse chez l'Homme (Köstlin et al., 2014).

Lymphocytes: Nous avons démontré une down-régulation des réponses B et T au niveau des deux environnements, comme le montre la Figure 61 où les gènes composant les fonctions

« *T cell response*, » ainsi que « *B cell development* » sont inhibés. Parmi ces gènes, on retrouve le CD86, STAT3, l'IL33, CD1D, RORA, NKKB1 ou encore BCL6.

STAT3 a été décrit comme un potentiel inducteur de tolérance T antigène spécifique (Cheng et al., 2003) et semble jouer un rôle aussi bien au niveau du microenvironnement tumoral (Yu et al., 2007) qu'au niveau de l'IFM (Fitzgerald et al., 2008).

Les cellules NKT rétreintes au CD1d ont été décrites comme une population pouvant intervenir dans la régulation de l'immunité anti-tumorale (Swann et al., 2004) (Neparidze and Dhodapkar, 2009) et dans l'avortement (Ito et al., 2000).

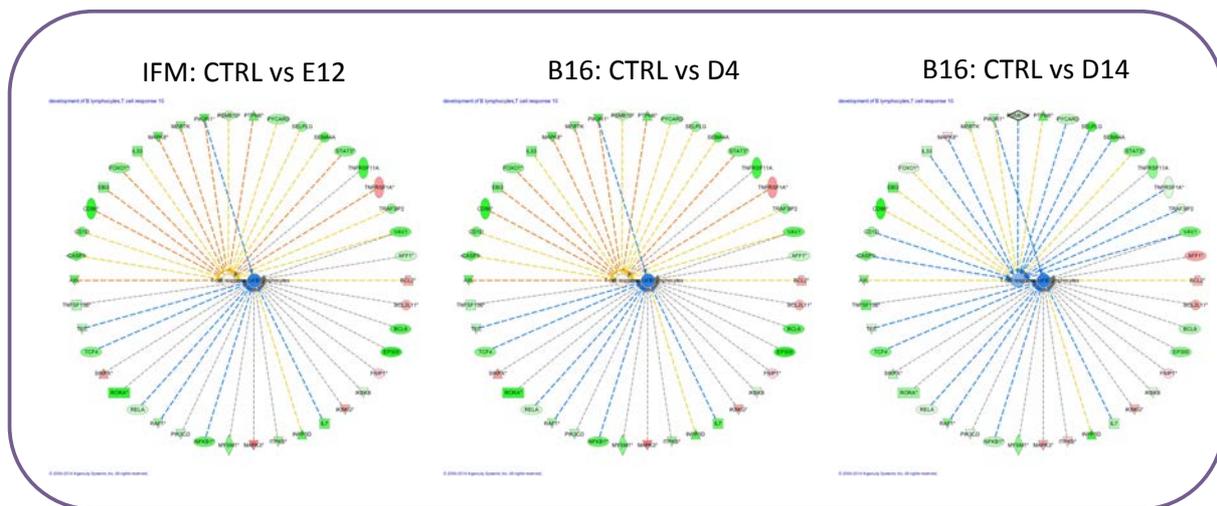
**Turnquist et al** ont montré que l'IL33 permet d'expandre les propriétés suppressives des cellules Tregs exprimant l'IL33R (Turnquist et al., 2011). De plus, l'IL33 en synergie avec ST2 semblent jouer un rôle dans la tolérance au niveau du microenvironnement tumoral d'un modèle d'adénocarcinome mammaire 4T1 et cela en favorisant le maintien des cellules dendritiques immatures (Jovanovic et al., 2012). Cependant, aucun rôle de l'IL33 n'a été décrit dans l'IFM et son rôle dans l'immunité anti-tumorale mérite d'être vérifié et validé.

IL8 –VEGF : Les GDE up-régulés font globalement partie des voies du cycle cellulaire, synthèse d'ADN et autres. Nous avons cependant observé des voies immunologiques up-régulée dès le quatrième jour après implantation (E4) telles que la voie de signalisation l'IL8 ou encore les voies du VEGF. Cette observation est expliquée par le fait que l'interface fœto-maternelle étant fortement vascularisée. La voie de l'IL8 est connue pour être facteur important à la fois dans le microenvironnement tumoral et l'interface fœto-maternelle. Cette voie de signalisation a été décrite pour être activée au niveau des cellules endothéliales, les neutrophiles et les macrophages présents dans le microenvironnement (Waugh and Wilson, 2008).

VEGF : Nous avons constaté que la voie de VEGF est fortement up-régulée à E4 mais pas au temps intermédiaire (E6, E8, E10), ni E11 pour l'être à nouveau à E12. Parmi les gènes up-régulés dans cette voir il y a FLT1, PTK2, PIK3R3, MAP2K2.

Les métalloprotéases : Les metalloprotéases (MPP) ont été décrites comme jouant un rôle clé au niveau d'IFM (Bollapragada et al., 2009) et du microenvironnement tumoral (Yodkeeree et al., 2009), (Lee et al., 2008). De plus, une étude a mis en évidence que l'inhibition de MMP9 chez la souris déclenche une baisse de l'expansion des cellules suppressives dans la moelle osseuse ainsi que dans le sang ce qui a pour conséquence un retard de croissance (Melani et al., 2007).

Les MPP semblent jouer un rôle primordial au sein des deux microenvironnements étudiés et l'inhibition de MMP9, par exemple, dans des souris gestantes ou injecter avec des tumeurs pourraient conduire à des résultats que l'on pense prometteurs.



**Figure 61. Comparaison GDE des IFM vs B16 pour deux fonctions immunitaires (« T cell response, » et « B cell development ».**

Nous avons représenté que E12 mais le même type de résultat a été obtenu à E4, E6, E10, E11 et E12.

### **b. Des signatures communes...**

En plus de ces similarités gène à gène, la comparaison des signatures moléculaires issues des deux jeux de données nous a permis de mettre en évidence une forte similarité entre les deux conditions. La Figure 54 traduit parfaitement la forte similarité existante entre les deux microenvironnements, car les signatures comparées sont spécifiques de chaque jeu de données (issues d'ICA). Or, la comparaison des annotations automatiques témoigne de l'existence de mécanismes communs. Cette similarité est beaucoup plus forte en entre les signatures down-régulées que celles qui sont up-régulées. Parmi les signatures avec une forte similarité en terme d'annotation et de gènes (Figure 55), les signatures down-régulées sont reliées à des voies de signalisation immunologiques contrairement aux signatures up-régulées. De plus, nous avons constaté qu'une signature extraite à partir du jeu de données B16 (ND036\_CONTROL\_J4\_T\_C2\_10) est celle qui est caractérisée par le plus de similarité avec des signatures issues du jeu IFM. L'annotation de cette signature révèle des voies de signalisation appartenant à la maturation des cellules dendritiques, des granulocytes, aux des interférons ou encore aux métalloprotéases. L'annotation des signatures « similaires » (même si la similarité est très faible) up-régulées a révélé un enrichissement pour les mécanismes de division cellulaire, cycle cellulaire qui est interprétable par la forte capacité de division des cellules tumorale dans un cas et des cellules embryonnaire dans l'autre.

Ceci confirme donc ce qui a été mis en évidence avec les GDE et plaide pour une induction de tolérance à travers l'inhibition de la maturation de cellules dendritiques et de la présentation antigénique.

## 2. Des voies de signalisation spécifiques

Cellules NK : Nous avons observé des voies de signalisation immunologiques significativement modulées qu'au niveau de l'IFM mais pas dans le microenvironnement tumoral. Parmi celles-ci, on retrouve la voie de signalisation concernant les cellules NKs qui est up-régulée à partir de E6 (Figure 47). Les cellules NK sont les cellules les plus abondantes au niveau de l'interface foëto-maternelle et constituent environ 70% des cellules immunitaires présentes au niveau de ce tissu (Carlino et al., 2008). Il a été décrit que ces cellules NK utérines sont recrutées à partir de la périphérie. Elles sont distinctes des cellules NK présente au niveau du sang périphérique car n'expriment plus le CD16 (FcR $\gamma$ IIIA), un récepteur requis pour l'ADCC. Cette perte du CD16 a été associée aux forts taux de TGF $\beta$  présents au niveau de l'interface (Keskin et al., 2007). De plus, à l'instar des NK sanguines, les NK utérines sont plutôt immuno-modulatrices que cytotoxiques grâce à la sécrétion galactin-1 permettant ainsi d'induire des cellules dendritiques tolérogéniques (Koopman et al., 2003). mais aussi des facteurs angiogéniques tels que le VEGF ou PGF qui sont, importants pour le remodelage du décidua (Plaks et al., 2008), (Murdoch et al., 2008). Les facteurs déterminants la balance cytotoxique et régulatrice des cellules NK méritent plus d'attention et peuvent conduire à l'identification de molécules cibles.

TLR : Nous avons observé une down régulation des voies de TLR au niveau de l'IFM et plus précisément les TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, MyD88 et CD14. Les TLR sont impliqués dans l'immunité innée et sont exprimés au niveau du placenta. En effet, il a été décrit que les dix types de TLRs ainsi que leurs récepteurs variés sont exprimés au niveau du placenta humain, (Klaffenbach et al., 2005), (Mitsunari et al., 2006). Très peu d'études se sont concentrées sur l'éventuel effet immuno-régulateurs des TLR sur les cellules de l'immunité innées telles que les macrophages. On peut penser qu'il existe un lien entre la tolérance induite au niveau de l'IFM et les TLRs à l'image de ce qui se produit au veau des tumeurs. En effet, au niveau du microenvironnement tumoral, les TLRs jouent un rôle « pro »-tumeurs via la sécrétion de diverses cytokines inflammatoires telles que l'IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL6 (Grivennikov et al., 2009). En effet, une expression trop importante d'IL1 $\beta$  induit les cellules suppressives MDSC (Tu et al., 2008) et « anti »-tumeurs via l'activation des cellules NK par les DCs (Ebihara et al., 2010) ou via l'inhibition des Tregs (Pasare and Medzhitov, 2003), (Peng et al., 2005).

En définitive, ces résultats mettent clairement en évidence, qu'aussi bien au niveau du microenvironnement tumoral qu'au niveau de l'interface foëto-maternelle, la plupart des voies de signalisations immunologiques significativement modulées sont inhibées ce qui traduit une induction de tolérance qui explique en partie la raison pour laquelle ni le foëtus, ni les cellules tumorales sont rejetés par le système immunitaire. Aussi, ces observations

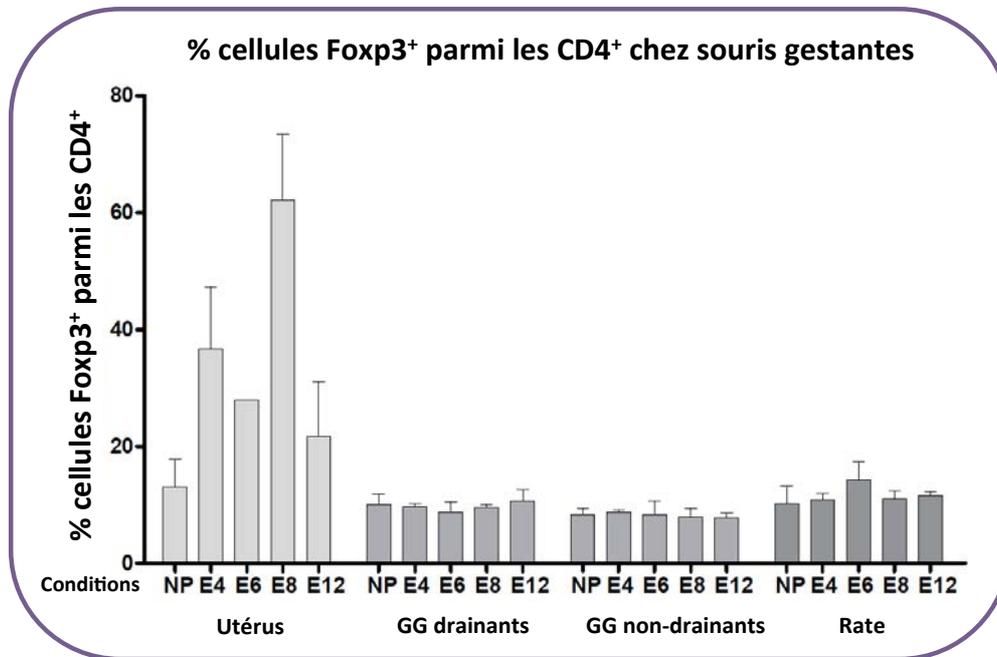
viennent conforter l'hypothèse émise dans le laboratoire selon laquelle la tumeur et le fœtus sont en quelque sorte « protégés » par les cellules Tregs qui instaurent un environnement tolérogène empêchant cellules effectrices d'intervenir.

## **II. Les cellules Tregs protègent les tumeurs... et le fœtus**

Les cellules régulatrices, et particulièrement les lymphocytes Tregs, jouent un rôle primordial dans « la protection » du fœtus des réponses effectrices de la mère (Aluvihare et al., 2004), (Chen et al., 2013). En effet, nous avons pu montrer une augmentation du pourcentage des Tregs (par cytométrie en flux) au niveau de l'utérus en comparaison avec les autres organes (ganglions drainants et non drainants et la rate) (Figure 62). Cette induction intra-utérine des Tregs est précoce et vient consolider les résultats que nous avons obtenu grâce à l'approche transcriptomique et à la stratégie d'analyse que nous avons mis en place. En effet, l'analyse des GDE et signatures moléculaires à E4, E6, E8, E10, E11 et E12 a mis en évidence une forte inhibition des voies de signalisation immunitaires [article en préparation]. La question que l'on peut se poser est : *que se produit-il au sein de l'IFM en cas d'élimination des cellules Tregs ?*

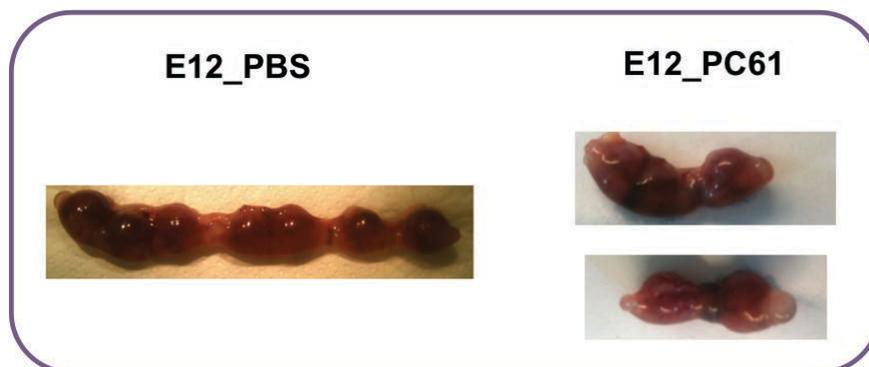
Une partie de la réponse est déjà connue car, dans différentes études, l'élimination des Tregs chez des souris gestantes a déclenché un rejet de fœtus (Samstein et al., 2012). Nous avons d'abord confirmé cette observation pour ensuite produire des données transcriptomiques. En effet, le traitement de souris gestantes avec un anti-CD25 (PC61) a conduit une augmentation significative du taux de rejet chez les souris traitées au PC61 en comparaison à celles traitées au PBS (Figure 63).

Les résultats préliminaires des analyses transcriptomiques comparant les souris gestantes (à E12) traitées au PC61 ou au PBS montrent une up-régulation massive des modules immunologiques (réponse immunitaire, présentation antigénique, cytokines) (Figure 64). Une analyse plus détaillée des GDE et des signatures est nécessaire car elle nous permettra certainement de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu pour maintenir le fœtus, sans que le système immunitaire effecteur de la mère n'intervienne.



**Figure 62. Cellules Tregs au niveau de l'utérus, ganglions et rate.**

Des cellules issues de différents organes (utérus, ganglions (GG) drainants et non drainants et rate) ont été marquées par des anticorps anti-CD3, CD4, CD25 et Foxp3 et le pourcentage des cellules Tregs a été calculé sur 5 souris.



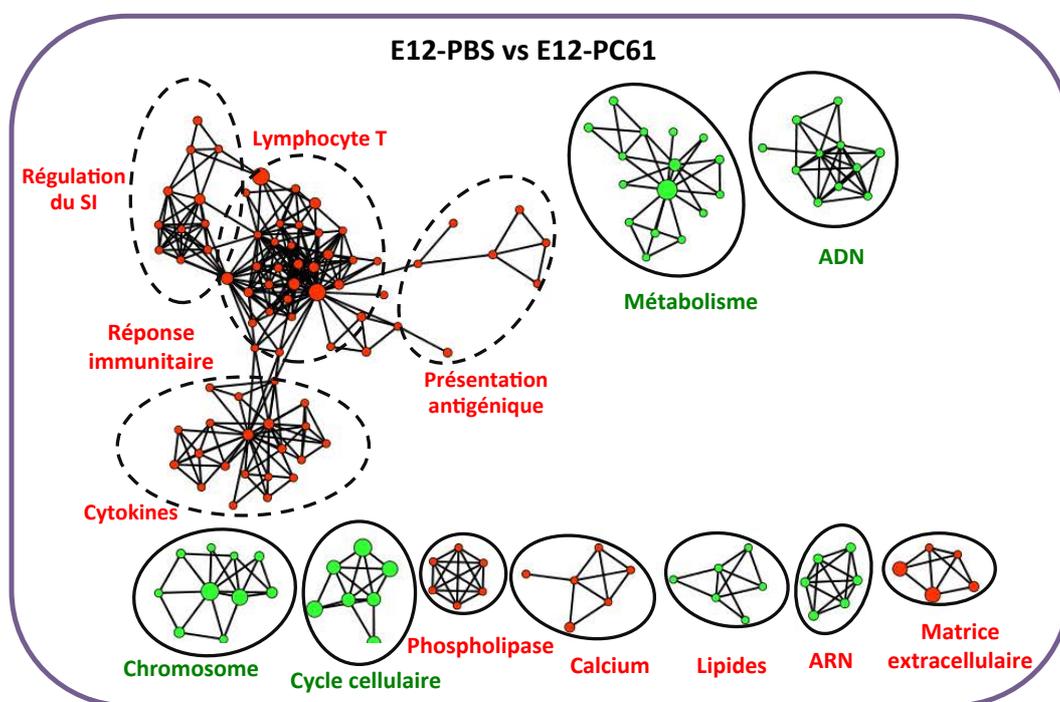
**Figure 63. Effet de la déplétion des Tregs sur le taux de rejet de fœtus chez la souris à E12.**

Utérus prélevés sur des souris gestantes traitées avec (à gauche) du PBS ou (à droite) du PC61. Le nombre de sites d'implantation embryonnaires est réduit avec le PC61 (2) comparé au traitement PBS (7). Le pourcentage de déplétion des Tregs était supérieur à 80% (dans les ganglions et dans le sang). Groupe PBS et PC61 = 5 souris.

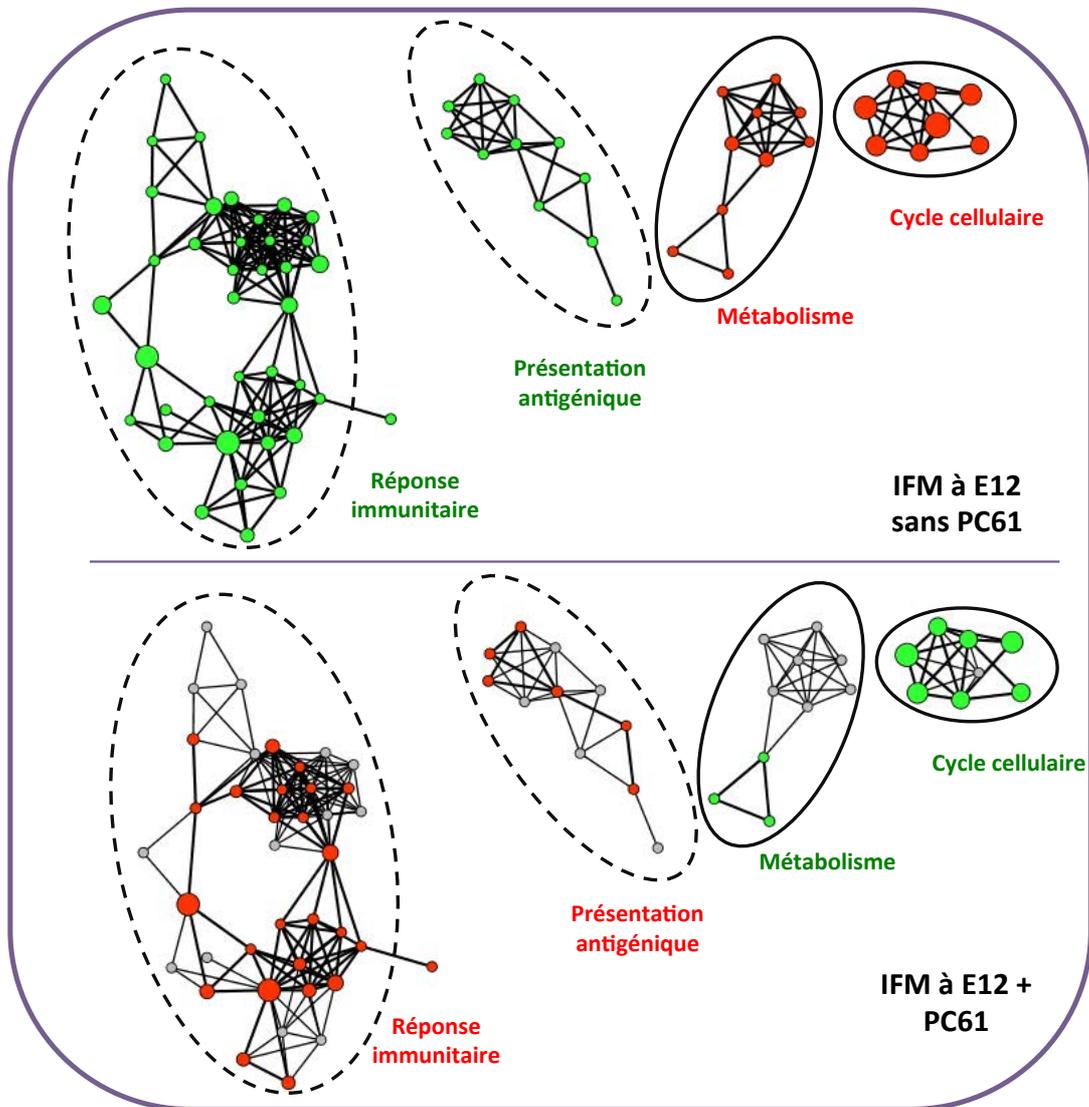
La comparaison des modules fonctionnels issue de l'IFM de souris traitées au PBS (analysés précédemment) à celles traitées au PC61 a mis en évidence une forte similarité entre les deux jeux de données. La Figure 65 démontre que les quatre modules principaux sont en commun entre les deux conditions, or la modulation bascule d'une down-régulation au niveau de l'IFM E12-PBS à une up-régulation dans l'IFM E12-PC61.

Ces résultats - bien que préliminaires - laissent présager le meilleur et nous suggèrent que la down-régulation des voies immunologiques mise en évidence dans la Figure 49 et la Figure 65 responsable du maintien de la grossesse et de la protection du fœtus du système immunitaire de hôte est principalement orchestrée par les cellules Tregs.

Cela étant dit, on peut raisonnablement penser que la déplétion d'autres sous-populations suppressives, telles que les MDSC, méritent d'être testée.



**Figure 64. Réseaux de modules fonctionnels de signatures moléculaires au niveau de l'IFM après élimination des Tregs à E12.**



**Figure 65. Comparaison des réseaux de modules fonctionnels de signatures moléculaires au niveau de l'IFM après élimination ou non des Tregs à E12.**

Les modules ont été générés en regroupant les nœuds participant au même mécanisme biologique. En rouge, les signatures (en commun) up-régulées, en vert les signatures (en commun) down-régulées et en gris, les signatures non partagées par les deux réseaux superposés. Les modules immunologiques sont représentés en pointillé. IFM=Interface foeto-maternelle. PC61 = anticorps permettant l'élimination des Tregs.

Au vu de nos résultats et des similarités entre les mécanismes mis en place au niveau du microenvironnement tumoral et de l'interface fœto-maternelle, nous pensons que les mécanismes déployés au cours de l'évolution pour protéger les fœtus du rejet immunitaire sont détournés, ce qui a pour conséquence le développement des cellules tumorales.

En définitive, si l'on considère les réponses immunitaires - régulatrices et effectrices - déclenchées contre les antigènes du soi et du non-soi des cellules cancéreuses, les réponses immunitaires anticancéreuses sont toujours une question d'équilibre ou de déséquilibre : auto vs. non-auto, mémoire vs. naïve, régulateur vs. effecteur, inhibition vs. activation, avantages vs. risques. Malheureusement, jusqu'à présent, cet équilibre est incliné vers le côté obscur (!).

Par conséquent, pour améliorer les immunothérapies du cancer, les efforts doivent se concentrer sur la manipulation des deux réponses, effectrices ET régulatrices. En outre, chaque déséquilibre nous offre le potentiel de retrouver un nouvel équilibre !

## V. REFERENCES

- Adotevi, O., Pere, H., Ravel, P., Haicheur, N., Badoual, C., Merillon, N., Medioni, J., Peyrard, S., Roncelin, S., Verkarre, V., et al. (2010). A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J. Immunother.* *33*, 991–998.
- Aebersold, R., and Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* *422*, 198–207.
- Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* *2*, 725–731.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* *403*, 503–511.
- Allantaz, F., Chaussabel, D., Stichweh, D., Bennett, L., Allman, W., Mejias, A., Ardura, M., Chung, W., Smith, E., Wise, C., et al. (2007). Blood leukocyte microarrays to diagnose systemic onset juvenile idiopathic arthritis and follow the response to IL-1 blockade. *The Journal of Experimental Medicine* *204*, 2131–2144.
- Alshaker, H.A., and Matalaka, K.Z. (2011). IFN-g, IL-17 and TGF-b involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. *Cancer Cell International* *11*, 33.
- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology* *5*, 266–271.
- Anderson, D.E. (2007). TIM-3 as a therapeutic target in human inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* *11*, 1005–1009.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* *25*, 25–29.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Aguezny, N.E.H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W.H., et al. (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res.* *12*, 465–472.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V., and Hafler, D.A. (2002). Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J. Immunol.* *169*, 6210–6217.
- Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 296–306.
- Beatty, G.L., and Paterson, Y. (2000). IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen. *J. Immunol.* *165*, 5502–5508.

- Belkaid, Y., and Oldenhove, G. (2008). Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 29, 362–371.
- Bellocq, A., Antoine, M., Flahault, A., Philippe, C., Crestani, B., Bernaudin, J.F., Mayaud, C., Milleron, B., Baud, L., and Cadranel, J. (1998). Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am. J. Pathol.* 152, 83–92.
- Benoist, C., Germain, R.N., and Mathis, D. (2006). A plaidoyer for “systems immunology.” *Immunological Reviews* 210, 229–234.
- Bergot, A.S., Durgeau, A., Levacher, B., Colombo, B.M., Cohen, J.L., and Klatzmann, D. (2010). Antigen quality determines the efficiency of antitumor immune responses generated in the absence of regulatory T cells. *Cancer Gene Therapy* 17, 645–654.
- von Bertalanffy, L. (1968). *General System Theory*. Braziler, New York.
- Beyer, M., Thabet, Y., Müller, R.-U., Sadlon, T., Classen, S., Lahl, K., Basu, S., Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Krebs, W., et al. (2011). Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. *Nat. Immunol.* 12, 898–907.
- Bhatnagar, R.M., Zabriskie, J.B., and Rausen, A.R. (1975). Cellular immune responses to methylcholanthrene-induced fibrosarcoma in BALB/c mice. *The Journal of Experimental Medicine* 142, 839–855.
- Bindea, G., Galon, J., and Mlecnik, B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29, 661–663.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093.
- Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196, 254–265.
- Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., et al. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406, 536–540.
- Blankenstein, T., Coulie, P.G., Gilboa, E., and Jaffee, E.M. (2012). The determinants of tumour immunogenicity. *Nature Reviews Cancer* 12, 307–313.
- Bollapragada, S., Bollopragada, S., Youssef, R., Jordan, F., Greer, I., Norman, J., and Nelson, S. (2009). Term labor is associated with a core inflammatory response in human fetal membranes, myometrium, and cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200, 104.e1–11.
- Brichard, V.G., Herman, J., Van Pel, A., Wildmann, C., Gaugler, B., Wölfel, T., Boon, T., and Lethé, B. (1996). A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26, 224–

- van den Broek, M.E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., Melief, C.J., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* *184*, 1781–1790.
- 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.
- Burnet, F. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, *13*, 1–27.
- Carlino, C., Stabile, H., Morrone, S., Bulla, R., Soriani, A., Agostinis, C., Bossi, F., Mocci, C., Sarazani, F., Tedesco, F., et al. (2008). Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood* *111*, 3108–3115.
- Carpentier, A.-S., Riva, A., Tisseur, P., Didier, G., and Hénaut, A. (2004). The operons, a criterion to compare the reliability of transcriptome analysis tools: ICA is more reliable than ANOVA, PLS and PCA. *Comput Biol Chem* *28*, 3–10.
- Carvunis, A.-R., Gomez, E., Thierry-Mieg, N., Trilling, L., and Vidal, M. (2009). [Systems biology: from yesterday's concepts to tomorrow's discoveries]. *Med Sci (Paris)* *25*, 578–584.
- Caucheteux, S.M., Kanellopoulos-Langevin, C., and Ojcius, D.M. (2003). At the innate frontiers between mother and fetus: linking abortion with complement activation. *Immunity* *18*, 169–172.
- Chabtini, L., Mfarrej, B., Mounayar, M., Zhu, B., Batal, I., Dakle, P.J., Smith, B.D., Boenisch, O., Najafian, N., Akiba, H., et al. (2013). TIM-3 regulates innate immune cells to induce fetomaternal tolerance. *J. Immunol.* *190*, 88–96.
- Chaouat, G., Assal Meliani, A., Martal, J., Raghupathy, R., Elliott, J.F., Elliot, J., Mosmann, T., and Wegmann, T.G. (1995). IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J. Immunol.* *154*, 4261–4268.
- Chaouat, G., and Voisin, G.A. (1979). Regulatory T cell subpopulations in pregnancy. I. Evidence for suppressive activity of the early phase of MLR. *J. Immunol.* *122*, 1383–1388.
- Chaput, N., Darrasse-Jèze, G., Bergot, A.-S., Cordier, C., Ngo-Abdalla, S., Klatzmann, D., and Azogui, O. (2007). Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J. Immunol.* *179*, 4969–4978.
- Chaussabel, D., Quinn, C., Shen, J., Patel, P., Glaser, C., Baldwin, N., Stichweh, D., Blankenship, D., Li, L., and Munagala, I. (2008). A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity* *29*, 150–164.

- Chen, M.-L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 419–424.
- Chen, T., Darrasse-Jèze, G., Bergot, A.-S., Courau, T., Churlaud, G., Valdivia, K., Strominger, J.L., Ruocco, M.G., Chaouat, G., and Klatzmann, D. (2013). Self-specific memory regulatory T cells protect embryos at implantation in mice. *The Journal of Immunology* *191*, 2273–2281.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+ CD25- naive T cells to CD4+ CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine* *198*, 1875–1886.
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Türeci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 1914–1918.
- Cheng, F., Wang, H.-W., Cuenca, A., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr, W.G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S.P., et al. (2003). A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* *19*, 425–436.
- Chiappetta, P., Roubaud, M.C., and Torrèsanì, B. (2004). Blind source separation and the analysis of microarray data. *J. Comput. Biol.* *11*, 1090–1109.
- Chuang, H.-Y., Hofree, M., and Ideker, T. (2010). A decade of systems biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *26*, 721.
- Chung, A.S., Wu, X., Zhuang, G., Ngu, H., Kasman, I., Zhang, J., Vernes, J.-M., Jiang, Z., Meng, Y.G., Peale, F.V., et al. (2013). An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Med.* *19*, 1114–1123.
- Ciampricotti, M., Hau, C.-S., Doornebal, C.W., Jonkers, J., and de Visser, K.E. (2012). Chemotherapy response of spontaneous mammary tumors is independent of the adaptive immune system. *Nature Medicine* *18*, 344–346.
- Ciampricotti, M., Vrijland, K., Hau, C.-S., Pemovska, T., Doornebal, C.W., Speksnijder, E.N., Wartha, K., Jonkers, J., and de Visser, K.E. (2011). Development of metastatic HER2+ breast cancer is independent of the adaptive immune system. *The Journal of Pathology* *224*, 56–66.
- Clark, D.A., Keil, A., Chen, Z., Markert, U., Manuel, J., and Gorczynski, R.M. (2003). Placental trophoblast from successful human pregnancies expresses the tolerance signaling molecule, CD200 (OX-2). *Am. J. Reprod. Immunol.* *50*, 187–195.
- Clark, D.A., Lea, R.G., Podor, T., Daya, S., Banwatt, D., and Harley, C. (1991). Cytokines determining the success or failure of pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences* *626*, 524–536.
- Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., et al. (2007). Integration of biological networks

- and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2, 2366–2382.
- Cobb, J.P., Mindrinos, M.N., Miller-Graziano, C., Calvano, S.E., Baker, H.V., Xiao, W., Laudanski, K., Brownstein, B.H., Elson, C.M., Hayden, D.L., et al. (2005). Application of genome-wide expression analysis to human health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4801–4806.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10, 942–949.
- Curti, B.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwse, T., Fox, B.A., et al. (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res.* 73, 7189–7198.
- Darrasse-Jèze, G., Darasse-Jèze, G., Klatzmann, D., Charlotte, F., Salomon, B.L., and Cohen, J.L. (2006). CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol. Lett.* 102, 106–109.
- Darrasse-Jèze, G., and Podsypanina, K. (2013). How numbers, nature, and immune status of Foxp3+ regulatory T-cells shape the early immunological events in tumor development. *Frontiers in Immunology* 4,.
- Davis, M.R., Manning, L.S., Whitaker, D., Garlepp, M.J., and Robinson, B.W. (1992). Establishment of a murine model of malignant mesothelioma. *Int. J. Cancer* 52, 881–886.
- Degl’Innocenti, E., Grioni, M., Capuano, G., Jachetti, E., Freschi, M., Bertilaccio, M.T.S., Hess-Michelini, R., Doglioni, C., and Bellone, M. (2008). Peripheral T-cell tolerance associated with prostate cancer is independent from CD4+CD25+ regulatory T cells. *Cancer Res.* 68, 292–300.
- Delbrück, M. (1949). Unités biologiques douées de continuité génétique. *Éditions Du CNRS*, 33-5,.
- Deng, G., Lu, Y., Zlotnikov, G., Thor, A.D., and Smith, H.S. (1996). Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* 274, 2057–2059.
- Dennis, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4, P3.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447–456.
- DiGIACOMO, A., and North, R.J. (1986). T cell suppressors of antitumor immunity. The production of Ly-1-, 2+ suppressors of delayed sensitivity precedes the production of suppressors of protective immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 164, 1179–1192.

- Disis, M.L., Bernhard, H., Gralow, J.R., Hand, S.L., Emery, S.R., Calenoff, E., and Cheever, M.A. (1994a). Immunity to the HER-2/neu oncogenic protein. *Ciba Found. Symp.* 187, 198–207; discussion 207–211.
- Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E., and Livingston, R.B. (1994b). Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 54, 16–20.
- Dolberg, D.S., and Bissell, M.J. (1984). Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature* 309, 552–556.
- Dranoff, G. (2005). CTLA-4 blockade: unveiling immune regulation. *J. Clin. Oncol.* 23, 662–664.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360.
- Ebihara, T., Azuma, M., Oshiumi, H., Kasamatsu, J., Iwabuchi, K., Matsumoto, K., Saito, H., Taniguchi, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2010). Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 207, 2675–2687.
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneeskde* 273–290.
- el-Shami, K., Tirosh, B., Bar-Haim, E., Carmon, L., Vadai, E., Fridkin, M., Feldman, M., and Eisenbach, L. (1999). MHC class I-restricted epitope spreading in the context of tumor rejection following vaccination with a single immunodominant CTL epitope. *Eur. J. Immunol.* 29, 3295–3301.
- van Elsas, A., Hurwitz, A.A., and Allison, J.P. (1999). Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J. Exp. Med.* 190, 355–366.
- Engleman, E.G., McMichael, A.J., and McDevitt, H.O. (1978). Suppression of the mixed lymphocyte reaction in man by a soluble T-cell factor. Specificity of the factor for both responder and stimulator. *The Journal of Experimental Medicine* 147, 1037–1043.
- Engreitz, J.M., Daigle, B.J., Marshall, J.J., and Altman, R.B. (2010). Independent component analysis: Mining microarray data for fundamental human gene expression modules. *Journal of Biomedical Informatics* 43, 932–944.
- Escudier, B. (2012). Emerging immunotherapies for renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 23 *Suppl 8*, viii35–40.
- Finke, J.H., Rini, B., Ireland, J., Rayman, P., Richmond, A., Golshayan, A., Wood, L., Elson, P., Garcia, J., Dreicer, R., et al. (2008). Sunitinib reverses type-1 immune suppression and

- decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6674–6682.
- Fisson, S., Darrasse-Jèze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., and Salomon, B.L. (2003). Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J. Exp. Med.* *198*, 737–746.
- Fitzgerald, J.S., Poehlmann, T.G., Schleussner, E., and Markert, U.R. (2008). Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum. Reprod. Update* *14*, 335–344.
- Fizet, D., and Bousquet, J. (1983). Absence of a factor blocking a cellular cytotoxicity reaction in the serum of women with recurrent abortions. *Br J Obstet Gynaecol* *90*, 453–456.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1182–1186.
- Folkman, J. (1996). New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur. J. Cancer* *32A*, 2534–2539.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor *foxp3*. *Immunity* *22*, 329–341.
- Fridlender, Z.G., and Albelda, S.M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* *33*, 949–955.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* *16*, 183–194.
- 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.
- Frigyesi, A., Veerla, S., Lindgren, D., and Höglund, M. (2006). Independent component analysis reveals new and biologically significant structures in micro array data. *BMC Bioinformatics* *7*, 290.
- Fu, T., He, Q., and Sharma, P. (2011). The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Res.* *71*, 5445–5454.
- Fujimoto, S., Greene, M.I., and Sehon, A.H. (1976). Regulation of the immune response to tumor antigens I. Immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *The Journal of Immunology* *116*, 791–799.
- Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* *2*, 1096–1103.
- Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1990). Cell surface glycoprotein of reactive

- stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *87*, 7235–7239.
- Garrido, F., Cabrera, T., and Aptsiauri, N. (2010). “Hard” and “soft” lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *International Journal of Cancer* *127*, 249–256.
- Gaucher, D., Therrien, R., Kettaf, N., Angermann, B.R., Boucher, G., Filali-Mouhim, A., Moser, J.M., Mehta, R.S., Drake, D.R., and Castro, E. (2008). Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *The Journal of Experimental Medicine* *205*, 3119–3131.
- Gene Ontology Consortium (2001). Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome Res.* *11*, 1425–1433.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* *5*, R80.
- Germain, R.N., Meier-Schellersheim, M., Nita-Lazar, A., and Fraser, I.D. (2011). Systems Biology in Immunology—A Computational Modeling Perspective. *Annual Review of Immunology* *29*, 527.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* *21*, 903–914.
- Getnet, D., Grosso, J.F., Goldberg, M.V., Harris, T.J., Yen, H.-R., Bruno, T.C., Durham, N.M., Hipkiss, E.L., Pyle, K.J., Wada, S., et al. (2010). A role for the transcription factor Helios in human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Molecular Immunology* *47*, 1595–1600.
- Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* *202*, 919–929.
- Gilbert, D.R., Schroeder, M., and van Helden, J. (2000). Interactive visualization and exploration of relationships between biological objects. *Trends Biotechnol.* *18*, 487–494.
- González-Martín, A., Gómez, L., Lustgarten, J., Mira, E., and Mañes, S. (2011). Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4(+) and CD8(+) T cells. *Cancer Res.* *71*, 5455–5466.
- Gorczynski, R.M., Lee, L., and Boudakov, I. (2005). Augmented Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation* *79*, 1180–1183.
- Gowans, J.L. (1959). The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J. Physiol. (Lond.)* *146*, 54–69.

- Gowans, J.L., McGREGOR, D.D., and Cowen, D.M. (1962). Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature* 196, 651–655.
- Greene, M.I., Fujimoto, S., and Sehon, A.H. (1977). Regulation of the Immune Response to Tumor Antigens III. Characterization of Thymic Suppressor Factor (s) Produced by Tumor-Bearing Hosts. *The Journal of Immunology* 119, 757–764.
- Greller, L.D., and Tobin, F.L. (1999). Detecting selective expression of genes and proteins. *Genome Res.* 9, 282–296.
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., et al. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15, 103–113.
- Hackstein, H., Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2001). Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol.* 22, 437–442.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Heikkinen, J., Möttönen, M., Alanen, A., and Lassila, O. (2004). Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clinical & Experimental Immunology* 136, 373–378.
- Herault, J., and Jutten, C. Space or time adaptive signal processing by neural network models, In *Neural Networks for Computing: AIP Conference Proceedings*. Proceeding AIP Conference Proceedings 151 on *Neural Networks for Computing`* 206–211.
- Herberman, R.B., and Holden, H.T. (1978). Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.* 27, 305–377.
- Hewitt, H.B., Blake, E.R., and Walder, A.S. (1976). A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *British Journal of Cancer* 33, 241.
- Hochberg, Y., and Benjamini, Y. (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 9, 811–818.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723.
- Hoheisel, J.D. (2006). Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat. Rev. Genet.* 7, 200–210.
- Holtan, S.G., Creedon, D.J., Haluska, P., and Markovic, S.N. (2009). Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin. Proc.* 84, 985–1000.
- Homey, B., Müller, A., and Zlotnik, A. (2002). Chemokines: agents for the immunotherapy

- of cancer? *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 175–184.
- Honorati, M.C., Neri, S., Cattini, L., and Facchini, A. (2006). Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthr. Cartil.* *14*, 345–352.
- Hori, G., and Inoue, J. (2001). Blind gene classification—an application of a signal separation method. *Genome Inf.* 255–25.
- Hortobagyi, G.N., Gutterman, J.U., Blumenschein, G.R., Tashima, C.K., Burgess, M.A., Einhorn, L., Buzdar, A.U., Richman, S.P., and Hersh, E.M. (1979). Combination chemoimmunotherapy of metastatic breast cancer with 5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide, and BCG. *Cancer* *43*, 1225–1233.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* *37*, 1–13.
- Hunter, L., Taylor, R.C., Leach, S.M., and Simon, R. (2001). GEST: a gene expression search tool based on a novel Bayesian similarity metric. *Bioinformatics* *17 Suppl 1*, S115–122.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2335–2342.
- Ihaka, R., and Gentleman, R. (1994). R: a language for data analysis and graphics. *J. Comp. Graph. Stat.*
- Ikehara, S., Pahwa, R.N., Fernandes, G., Hansen, C.T., and Good, R.A. (1984). Functional T cells in athymic nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 886–888.
- Ilyin, S.E., Belkowski, S.M., and Plata-Salamán, C.R. (2004). Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends Biotechnol.* *22*, 411–416.
- Isoe, S., Naganuma, H., Nakano, S., Sasaki, A., Satoh, E., Nagasaka, M., Maeda, S., and Nukui, H. (1998). Resistance to growth inhibition by transforming growth factor-beta in malignant glioma cells with functional receptors. *J. Neurosurg.* *88*, 529–534.
- Ito, K., Karasawa, M., Kawano, T., Akasaka, T., Koseki, H., Akutsu, Y., Kondo, E., Sekiya, S., Sekikawa, K., Harada, M., et al. (2000). Involvement of decidual Valpha14 NKT cells in abortion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 740–744.
- Jiang, S.P., and Vacchio, M.S. (1998). Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal “allograft.” *J. Immunol.* *160*, 3086–3090.
- Jonason, A.S., Kunala, S., Price, G.J., Restifo, R.J., Spinelli, H.M., Persing, J.A., Leffell, D.J., Tarone, R.E., and Brash, D.E. (1996). Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 14025–14029.
- Jovanovic, I.P., Pejnovic, N.N., Radosavljevic, G.D., Arsenijevic, N.N., and Lukic, M.L. (2012). IL-33/ST2 axis in innate and acquired immunity to tumors. *Oncoimmunology* *1*, 229–231.

- Jungbluth, A.A., Old, L.J., and Chen, Y.-T. (2002). Matthew J. Scanlan Cancer/testis antigens: an expanding Ali O. Gure family of targets for cancer. *Immunological Reviews* 188, 22–32.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Katayama, T., Kawashima, S., Okuda, S., Tokimatsu, T., et al. (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* 36, D480–484.
- Kang, Y., Chen, C.-R., and Massagué, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* 11, 915–926.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 7556–7561.
- Karim, M., Feng, G., Wood, K.J., and Bushell, A.R. (2005). CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood* 105, 4871–4877.
- Kaufman, D.L., Clare-Salzler, M., Tian, J., Forsthuber, T., Ting, G.S., Robinson, P., Atkinson, M.A., Sercarz, E.E., Tobin, A.J., and Lehmann, P.V. (1993). Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366, 69–72.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Yannelli, J.R., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1994). Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180, 347–352.
- Keskin, D.B., Allan, D.S.J., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Stern, J.N.H., Kopcow, H.D., Koopman, L.A., and Strominger, J.L. (2007). TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3378–3383.
- Kilinc, M.O., Aulakh, K.S., Nair, R.E., Jones, S.A., Alard, P., Kosiewicz, M.M., and Egilmez, N.K. (2006). Reversing tumor immune suppression with intratumoral IL-12: activation of tumor-associated T effector/memory cells, induction of T suppressor apoptosis, and infiltration of CD8+ T effectors. *J. Immunol.* 177, 6962–6973.
- Klaffenbach, D., Rascher, W., Röllinghoff, M., Dötsch, J., Meissner, U., and Schnare, M. (2005). Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorioncarcinoma cell lines. *Am. J. Reprod. Immunol.* 53, 77–84.
- Klein, G., and Klein, E. (1977). Immune surveillance against virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 2121–2125.
- von Kleist, S., and Burtin, P. (1969). Isolation of a fetal antigen from human colonic

- tumors. *Cancer Res.* 29, 1961–1964.
- Kmieciak, M., Morales, J.K., Morales, J., Bolesta, E., Grimes, M., and Manjili, M.H. (2008). Danger signals and nonself entity of tumor antigen are both required for eliciting effective immune responses against HER-2/neu positive mammary carcinoma: implications for vaccine design. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1391–1398.
- Knutson, K.L., and Disis, M.L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 721–728.
- Ko, J.S., Zea, A.H., Rini, B.I., Ireland, J.L., Elson, P., Cohen, P., Golshayan, A., Rayman, P.A., Wood, L., Garcia, J., et al. (2009). Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* 15, 2148–2157.
- 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.
- Koopman, L.A., Kopcow, H.D., Rybalov, B., Boyson, J.E., Orange, J.S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C.J., Schachter, A.D., Park, P.J., et al. (2003). Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.* 198, 1201–1212.
- Köstlin, N., Kugel, H., Spring, B., Leiber, A., Marmé, A., Henes, M., Rieber, N., Hartl, D., Poets, C.F., and Gille, C. (2014). Granulocytic myeloid-derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *European Journal of Immunology*.
- Lanigan, F., O'Connor, D., Martin, F., and Gallagher, W.M. (2007). Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 3159–3184.
- Larmonier, N., Marron, M., Zeng, Y., Cantrell, J., Romanoski, A., Sepassi, M., Thompson, S., Chen, X., Andreansky, S., and Katsanis, E. (2007). Tumor-derived CD4(+)CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 48–59.
- Lee, K.J., Hwang, S.J., Choi, J.H., and Jeong, H.G. (2008). Saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorum* inhibit HT-1080 cell invasion and MMPs activities: regulation of NF-kappaB activation via ROS signal pathway. *Cancer Lett.* 268, 233–243.
- Lee, N.J., Choi, D.Y., Song, J.K., Jung, Y.Y., Kim, D.H., Kim, T.M., Kim, D.J., Kwon, S.M., Kim, K.B., Choi, K.E., et al. (2012). Deficiency of C-C chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF- $\kappa$ B and inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 in urethane-induced lung tumor model. *Carcinogenesis* 33, 2520–2528.
- Leek, R.D., Lewis, C.E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., and Harris, A.L. (1996). Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive

- breast carcinoma. *Cancer Res.* *56*, 4625–4629.
- Lehmann, P.V., Forsthuber, T., Miller, A., and Sercarz, E.E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* *358*, 155–157.
- Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R.A., Lifke, A., Ferel, D., Wölfel, C., Huber, C., and Wölfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 16013–16018.
- Lewis, M.P., Lygoe, K.A., Nystrom, M.L., Anderson, W.P., Speight, P.M., Marshall, J.F., and Thomas, G.J. (2004). Tumour-derived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br. J. Cancer* *90*, 822–832.
- Li, J., and Bushel, P.R. (2014). Estimating batch effect in Microarray data with Principal Variance Component Analysis(PVCA) method.
- Liebermeister, W. (2002). Linear modes of gene expression determined by independent component analysis. *Bioinformatics* *18*, 51–60.
- Liu, V.C., Wong, L.Y., Jang, T., Shah, A.H., Park, I., Yang, X., Zhang, Q., Lonning, S., Teicher, B.A., and Lee, C. (2007). Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J. Immunol.* *178*, 2883–2892.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., et al. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* *14*, 1675–1680.
- Lockhart, D.J., and Winzler, E.A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* *405*, 827–836.
- Long, A.D., Mangalam, H.J., Chan, B.Y., Toller, L., Hatfield, G.W., and Baldi, P. (2001). Improved statistical inference from DNA microarray data using analysis of variance and a Bayesian statistical framework. *Analysis of global gene expression in Escherichia coli K12. J. Biol. Chem.* *276*, 19937–19944.
- Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* *21*, 3448–3449.
- Malchow, S., Leventhal, D.S., and Savage, P.A. (2013). Organ-specific regulatory T cells of thymic origin are expanded in murine prostate tumors. *Oncoimmunology* *2*.
- Maleckar, J.R., and Sherman, L.A. (1987). The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J. Immunol.* *138*, 3873–3876.
- Maniati, E., and Hagemann, T. (2013). IL-17 mediates resistance to anti-VEGF therapy. *Nat. Med.* *19*, 1092–1094.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2

- mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555.
- Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* *74*, 181–273.
- Markiewicz, M.A., Fallarino, F., Ashikari, A., and Gajewski, T.F. (2001). Epitope spreading upon P815 tumor rejection triggered by vaccination with the single class I MHC-restricted peptide P1A. *Int. Immunol.* *13*, 625–632.
- Marshall, C.J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell* *64*, 313–326.
- Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G.M., Jacobsen, E.S., Polansky, J.K., MacIsaac, K.D., Levine, S.S., Fraenkel, E., von Boehmer, H., and Young, R.A. (2007). Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* *445*, 931–935.
- Martoglio, A.-M., Miskin, J.W., Smith, S.K., and MacKay, D.J.C. (2002). A decomposition model to track gene expression signatures: preview on observer-independent classification of ovarian cancer. *Bioinformatics* *18*, 1617–1624.
- Marzo, A.L., Lake, R.A., Lo, D., Sherman, L., McWilliam, A., Nelson, D., Robinson, B.W., and Scott, B. (1999). Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes. *J. Immunol.* *162*, 5838–5845.
- McCullough, K.D., Coleman, W.B., Ricketts, S.L., Wilson, J.W., Smith, G.J., and Grisham, J.W. (1998). Plasticity of the neoplastic phenotype in vivo is regulated by epigenetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 15333–15338.
- McDaniel, S.M., Rumer, K.K., Biroc, S.L., Metz, R.P., Singh, M., Porter, W., and Schedin, P. (2006). Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis. *Am. J. Pathol.* *168*, 608–620.
- McRae, B.L., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., and Miller, S.D. (1995). Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* *182*, 75–85.
- Medawar, P.. (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat* *78*, 176–199.
- Melani, C., Chiodoni, C., Forni, G., and Colombo, M.P. (2003). Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* *102*, 2138–2145.
- Melani, C., Sangaletti, S., Barazzetta, F.M., Werb, Z., and Colombo, M.P. (2007). Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer Res.* *67*, 11438–11446.
- Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D.M., and Chen, L. (2007). Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 95–106.

- Ménétrier-Caux, C., Gobert, M., and Caux, C. (2009). Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res.* 69, 7895–7898.
- Menges, M., Rössner, S., Voigtländer, C., Schindler, H., Kukutsch, N.A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M.B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* 195, 15–21.
- Le Meur, N., Lamirault, G., Bihouée, A., Steenman, M., Bédrine-Ferran, H., Teusan, R., Ramstein, G., and Léger, J.J. (2004). A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res.* 32, 5349–5358.
- Mitsunari, M., Yoshida, S., Shoji, T., Tsukihara, S., Iwabe, T., Harada, T., and Terakawa, N. (2006). Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J. Reprod. Immunol.* 72, 46–59.
- Monod, J., and Jacob, F. (1961). Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 26, 389–401.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., et al. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273.
- Morel, S., Lévy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., et al. (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107–117.
- Mueller, M.M., and Fusenig, N.E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 839–849.
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A.L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191–1193.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 618–631.
- Neparidze, N., and Dhodapkar, M.V. (2009). Harnessing CD1d-restricted T cells toward antitumor immunity in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1174, 61–67.
- Newton, M.A., Kendzierski, C.M., Richmond, C.S., Blattner, F.R., and Tsui, K.W. (2001). On differential variability of expression ratios: improving statistical inference about gene expression changes from microarray data. *J. Comput. Biol.* 8, 37–52.
- Nicholson, T.L. (2007). Construction and validation of a first-generation *Bordetella bronchiseptica* long-oligonucleotide microarray by transcriptional profiling the Bvg regulon. *BMC Genomics* 8, 220.

- Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., Nakayama, T., et al. (2003). CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 10902–10906.
- Noël, A., and Foidart, J.M. (1998). The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *3*, 215–225.
- North, R.J., and Bursucker, I. (1984). Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+ 2-suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *The Journal of Experimental Medicine* *159*, 1295–1311.
- Novick, A., and Weiner, M. (1957). Enzyme induction as an all-or-none phenomenon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *43*, 553.
- Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* *101*, 2620–2627.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor  $\alpha$ ) monoclonal antibody. *Cancer Research* *59*, 3128–3133.
- Overwijk, W.W., Lee, D.S., Surman, D.R., Irvine, K.R., Touloukian, C.E., Chan, C.C., Carroll, M.W., Moss, B., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (1999). Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a “self” antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 2982–2987.
- Overwijk, W.W., and Restifo, N.P. (2000). Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the “self” to destroy the “other.” *Crit. Rev. Immunol.* *20*, 433–450.
- Ozao-Choy, J., Ma, G., Kao, J., Wang, G.X., Meseck, M., Sung, M., Schwartz, M., Divino, C.M., Pan, P.-Y., and Chen, S.-H. (2009). The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.* *69*, 2514–2522.
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 807–839.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* *299*, 1033–1036.
- Pekarek, L.A., Starr, B.A., Toledano, A.Y., and Schreiber, H. (1995). Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.* *181*, 435–440.
- Van Pel, A., Vessière, F., and Boon, T. (1983). Protection against two spontaneous mouse leukemias conferred by immunogenic variants obtained by mutagenesis. *J. Exp. Med.* *157*, 1992–2001.
- Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K.S., Peng, W., Fu, T., Wang, D.Y., Li, Y., Wang, H.Y., and

- Wang, R.-F. (2005). Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* 309, 1380–1384.
- Pere, H., Montier, Y., Bayry, J., Quintin-Colonna, F., Merillon, N., Dransart, E., Badoual, C., Gey, A., Ravel, P., Marcheteau, E., et al. (2011). A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood* 118, 4853–4862.
- Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K., and Roederer, M. (2004). Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 648–655.
- Pernot, S., Terme, M., Voron, T., Colussi, O., Marcheteau, E., Tartour, E., and Taieb, J. (2014). Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J. Gastroenterol.* 20, 3738–3750.
- Pham, H.-P., Dérian, N., Chaara, W., Bellier, B., Klatzmann, D., and Six, A. (2014). A novel strategy for molecular signature discovery based on independent component analysis. *International Journal of Data Mining and Bioinformatics* 9, 277–304.
- Plaks, V., Birnberg, T., Berkutzki, T., Sela, S., BenYashar, A., Kalchenko, V., Mor, G., Keshet, E., Dekel, N., Neeman, M., et al. (2008). Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3954–3965.
- Prehn, R., and Main, J. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18, 769–778.
- Preiss, S., Kammertoens, T., Lampert, C., Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2005). Tumor-induced antibodies resemble the response to tissue damage. *International Journal of Cancer* 115, 456–462.
- Pulendran, B., Li, S., and Nakaya, H.I. (2010). Systems vaccinology. *Immunity* 33, 516–529.
- Quackenbush, J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet.* 32 Suppl, 496–501.
- Querec, T.D., Akondy, R.S., Lee, E.K., Cao, W., Nakaya, H.I., Teuwen, D., Pirani, A., Gernert, K., Deng, J., and Marzolf, B. (2008). Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature Immunology* 10, 116–125.
- Quezada, S.A., Peggs, K.S., Curran, M.A., and Allison, J.P. (2006). CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 116, 1935–1945.
- Rapp, H.J. (1979). Appropriateness of Animal Models for the Immunology of Human Cancer Correspondence re: HB Hewitt. The Choice of Animal Tumors of Experimental Studies of Studies of Cancer Therapy. *Adv. Cancer Res.*, 27; 149-200, 1978. *Cancer Research* 39, 4285–4286.
- Ribas, A., Timmerman, J.M., Butterfield, L.H., and Economou, J.S. (2003). Determinant spreading and tumor responses after peptide-based cancer immunotherapy. *Trends*

Immunol. 24, 58–61.

- Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 73–91.
- Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 1185–1192.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., M D, J.W., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., et al. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 2517–2526.
- Rønnov-Jessen, L., Petersen, O.W., and Bissell, M.J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.* 76, 69–125.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., and Restifo, N.P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 909–915.
- Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 323–370.
- Saidi, S.A., Holland, C.M., Kreil, D.P., MacKay, D.J.C., Charnock-Jones, D.S., Print, C.G., and Smith, S.K. (2004). Independent component analysis of microarray data in the study of endometrial cancer. *Oncogene* 23, 6677–6683.
- Saito, R., Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L., Lotia, S., Pico, A.R., Bader, G.D., and Ideker, T. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature Methods* 9, 1069–1076.
- Sakaguchi, S., Takahashi, T., and Nishizuka, Y. (1982). Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *The Journal of Experimental Medicine* 156, 1565–1576.
- Samstein, R.M., Arvey, A., Josefowicz, S.Z., Peng, X., Reynolds, A., Sandstrom, R., Neph, S., Sabo, P., Kim, J.M., Liao, W., et al. (2012). Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* 151, 153–166.
- Sappino, A.P., Skalli, O., Jackson, B., Schürch, W., and Gabbiani, G. (1988). Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int. J. Cancer* 41, 707–712.
- Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., and Saito, S. (2004). Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 347–353.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467–470.
- Schmid, R., Baum, P., Ittrich, C., Fundel-Clemens, K., Huber, W., Brors, B., Eils, R., Weith, A., Mennerich, D., and Quast, K. (2010). Comparison of normalization methods for

- Illumina BeadChip HumanHT-12 v3. *BMC Genomics* 11, 349.
- 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.
- Seliger, B., Maeurer, M.J., and Ferrone, S. (1997). TAP off--tumors on. *Immunol. Today* 18, 292–299.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13, 2498–2504.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 163, 5211–5218.
- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., and Bissell, M.J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 128, 3117–3131.
- Skipper, J.C., Kittlesen, D.J., Hendrickson, R.C., Deacon, D.D., Harthun, N.L., Wagner, S.N., Hunt, D.F., Engelhard, V.H., and Slingluff, C.L. (1996). Shared epitopes for HLA-A3-restricted melanoma-reactive human CTL include a naturally processed epitope from Pmel-17/gp100. *J. Immunol.* 157, 5027–5033.
- Smith, B., Williams, J., and Schulze-Kremer, S. (2003a). The ontology of the gene ontology. *AMIA Annu Symp Proc* 609–613.
- Smith, B., Williams, J., and Steffen, S.-K. (2003b). The ontology of the gene ontology. In *AMIA Annual Symposium Proceedings, (American Medical Informatics Association)*, p. 609.
- Smoot, M., Ono, K., Ideker, T., and Maere, S. (2011). PiNGO: a Cytoscape plugin to find candidate genes in biological networks. *Bioinformatics* 27, 1030–1031.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* 192, 755–760.
- Street, S.E., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192–197.
- Stutman, O. (1973). Immunological aspects of resistance to the oncogenic effect of 3-methylcholanthrene in mice. *Isr. J. Med. Sci.* 9, 217–228.
- Stutman, O. (1979). Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 353–358.

- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 15545–15550.
- Sutmuller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E., Offringa, R., and Melief, C.J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* *194*, 823–832.
- Swann, J., Crowe, N.Y., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2004). Regulation of antitumour immunity by CD1d-restricted NKT cells. *Immunol. Cell Biol.* *82*, 323–331.
- Tafari, A., Alferink, J., Möller, P., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (1995). T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* *270*, 630–633.
- Takeuchi, N., Hiraoka, S.-I., Zhou, X.-Y., Nagafuku, M., Ono, S., Tsujimura, T., Nakazawa, M., Yura, Y., Hamaoka, T., and Fujiwara, H. (2004). Anti-HER-2/neu immune responses are induced before the development of clinical tumors but declined following tumorigenesis in HER-2/neu transgenic mice. *Cancer Res.* *64*, 7588–7595.
- Tazawa, H., Okada, F., Kobayashi, T., Tada, M., Mori, Y., Une, Y., Sendo, F., Kobayashi, M., and Hosokawa, M. (2003). Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *Am. J. Pathol.* *163*, 2221–2232.
- Terme, M., Tartour, E., and Taieb, J. (2013). VEGFA. VEGFR2-targeted Therapies Prevent the VEGFA-induced Proliferation of Regulatory T Cells in Cancer.
- Teschendorff, A.E., Journée, M., Absil, P.A., Sepulchre, R., and Caldas, C. (2007). Elucidating the altered transcriptional programs in breast cancer using independent component analysis. *PLoS Comput. Biol.* *3*, e161.
- Thomas, R., and D’Ari, R. (1990). *Biological feedback*. Boca Raton, Florida : CRC Press 316.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* *188*, 287–296.
- Treves, A.J., Carnaud, C., Trainin, N., Feldman, M., and Cohen, I.R. (1974). Enhancing T lymphocytes from tumor-bearing mice suppress host resistance to a syngeneic tumor. *European Journal of Immunology* *4*, 722–727.
- Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E.A., Rickman, B., Betz, K.S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J.G., et al. (2008). Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* *14*, 408–419.
- Turnquist, H.R., Zhao, Z., Rosborough, B.R., Liu, Q., Castellaneta, A., Isse, K., Wang, Z.,

- Lang, M., Stolz, D.B., Zheng, X.X., et al. (2011). IL-33 expands suppressive CD11b<sup>+</sup> Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J. Immunol.* *187*, 4598–4610.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 5116–5121.
- Vanderlugt, C.L., and Miller, S.D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 85–95.
- Vanneman, M., and Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer* *12*, 237–251.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* *270*, 484–487.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 20884–20889.
- Venet, D., Dumont, J.E., and Detours, V. (2011). Most random gene expression signatures are significantly associated with breast cancer outcome. *PLoS Computational Biology* *7*, e1002240.
- Verhagen, J., and Wraith, D.C. (2010). Comment on “Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells.” *The Journal of Immunology* *185*, 7129–7129.
- 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.
- Voisin, G.A., and Chaouat, G. (1974). Demonstration, nature and properties of maternal antibodies fused on placenta and directed against paternal alloantigens. *J Reprod Fertil* *1974 ; 2 1 (suppl)*, 89–107.
- Wada, J., Suzuki, H., Fuchino, R., Yamasaki, A., Nagai, S., Yanai, K., Koga, K., Nakamura, M., Tanaka, M., Morisaki, T., et al. (2009). The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer Res.* *29*, 881–888.
- Waddington, C.. (1957). *The strategy of the genes*. London : George Allen and Unwin.
- Wang, H.Y., Peng, G., Guo, Z., Shevach, E.M., and Wang, R.-F. (2005). Recognition of a new ARTC1 peptide ligand uniquely expressed in tumor cells by antigen-specific CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *The Journal of Immunology* *174*, 2661–2670.
- Wang, R., Kozhaya, L., Mercer, F., Khaitan, A., Fujii, H., and Unutmaz, D. (2009). Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 13439–13444.
- Watanabe, T., Watanabe, S., Neumann, G., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2002). Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *Journal of Virology* *76*, 767–773.

- Waugh, D.J.J., and Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6735–6741.
- Weinberg, R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* *254*, 1138–1146.
- Weiner, L.M., and Adams, G.P. (2000). New approaches to antibody therapy. *Oncogene* *19*, 6144–6151.
- Weisburger, J.H., and Williams, G.M. (1981). Carcinogen testing: current problems and new approaches. *Science* *214*, 401–407.
- Wiener, N. (1948). *Cybernetics or Control and Communication in the Animal and the Machine*. The MIT Press, Cambridge.
- Wiener, N. (1956). *I am a mathematician*.
- Wierecky, J., Mueller, M., and Brossart, P. (2006). Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1. *Cancer Immunol. Immunother.* *55*, 63–67.
- Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2005). Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* *437*, 141–146.
- Willimsky, G., Czéh, M., Loddenkemper, C., Gellermann, J., Schmidt, K., Wust, P., Stein, H., and Blankenstein, T. (2008). Immunogenicity of premalignant lesions is the primary cause of general cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness. *J. Exp. Med.* *205*, 1687–1700.
- Willimsky, G., Schmidt, K., Loddenkemper, C., Gellermann, J., Blankenstein, T., and others (2013). Virus-induced hepatocellular carcinomas cause antigen-specific local tolerance. *The Journal of Clinical Investigation* *123*, 1032–1043.
- Wiseman, B.S., and Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* *296*, 1046–1049.
- Wittig, U., and De Beuckelaer, A. (2001). Analysis and comparison of metabolic pathway databases. *Brief. Bioinformatics* *2*, 126–142.
- Wold, B., and Myers, R.M. (2008). Sequence census methods for functional genomics. *Nat. Methods* *5*, 19–21.
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* *269*, 1281–1284.
- Worschech, A., Kmiecik, M., Knutson, K.L., Bear, H.D., Szalay, A.A., Wang, E., Marincola, F.M., and Manjili, M.H. (2008). Signatures associated with rejection or recurrence in HER-2/neu-positive mammary tumors. *Cancer Res.* *68*, 2436–2446.
- Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Stenson, M.J., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2006). Intratumoral CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* *107*, 3639–3646.
- Yodkeeree, S., Chaiwangyen, W., Garbisa, S., and Limtrakul, P. (2009). Curcumin,

- demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. *J. Nutr. Biochem.* *20*, 87–95.
- Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 757–768.
- Yu, G., Li, F., Qin, Y., Bo, X., Wu, Y., and Wang, S. (2010). GOSemSim: an R package for measuring semantic similarity among GO terms and gene products. *Bioinformatics* *26*, 976–978.
- Yu, H., Kortylewski, M., and Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 41–51.
- Zabransky, D.J., Nirschl, C.J., Durham, N.M., Park, B.V., Ceccato, C.M., Bruno, T.C., Tam, A.J., Getnet, D., and Drake, C.G. (2012). Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PloS One* *7*, e34547.
- Zaidi, M.R., and Merlino, G. (2011). The two faces of interferon- $\gamma$  in cancer. *Clinical Cancer Research* *17*, 6118–6124.
- Zelenay, S., Lopes-Carvalho, T., Caramalho, I., Moraes-Fontes, M.F., Rebelo, M., and Demengeot, J. (2005). Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 4091–4096.
- Zhang, J., and Liu, J. (2013). Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* *137*, 200–215.
- Zhang, X.W., Yap, Y.L., Wei, D., Chen, F., and Danchin, A. (2005). Molecular diagnosis of human cancer type by gene expression profiles and independent component analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* *13*, 1303–1311.
- Zheng, S.G., Gray, J.D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S., and Horwitz, D.A. (2002). Generation ex vivo of TGF- $\beta$ -producing regulatory T cells from CD4+ CD25- precursors. *The Journal of Immunology* *169*, 4183–4189.
- Zhou, G., and Levitsky, H.I. (2007). Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *The Journal of Immunology* *178*, 2155–2162.
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* *6*, 1245–1252.
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J. Clin. Invest.* *118*, 1991–2001.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 715–727.

**VI. ARTICLE 3 Nehar-Belaid et al, soumis.**

# The immunotolerant microenvironments of pregnancy and cancer are similar and orchestrated by regulatory T cells

Djamel Nehar-Belaid <sup>a, b, c</sup>, Tristan Courau <sup>a, b, c</sup>, Nicolas Dérian <sup>a, b, c</sup>, Laura Florez <sup>a, b, c</sup>, Maria-Grazia Ruocco <sup>a, b, c</sup> and David Klatzmann <sup>a, b, c, d</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, I<sup>3</sup>, F-75013, Paris, France

<sup>b</sup> INSERM, UMR\_S 959, F-75013, Paris, France

<sup>c</sup> CNRS, FRE3632, F-75013, Paris, France

<sup>d</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Department of Biotherapies and the Clinical Investigation Center in Biotherapy, F-75013, Paris, France

Corresponding author: david.klatzmann@upmc.fr

## Abstract

**Embryos and tumors are masses of dividing cells expressing foreign antigens, though not rejected by the immune system. We hypothesized that immunotolerance could be similar in these settings, and orchestrated by regulatory T cells (Tregs). Comparison of fetal and tumor microenvironments through transcriptomics revealed strikingly similar and dramatic decrease in expression of multiple immune-related pathways, including antigen presentation and T cell response. Unsupervised analyses highlighted the co-evolution in time of down-regulated immune signatures, from the very first days after tumor or embryo implantation. Treg depletion, which leads to fetus or tumor rejection, converted the very same down-modulated immune signatures to up-regulated ones. We propose that means selected during evolution to protect mammalian fetuses are hijacked to license tumor development. 119 words**

## Introduction

There are striking similarities between fetus and tumor development (1). They both require intense cell division, invasion of host tissues and sustained vascularization. Moreover, despite that fetus and tumor express foreign antigens - paternal allo-antigens for fetuses and modified auto-antigens for tumors - they are not rejected by the immune system. Regulatory T cells (Tregs), which are key players in tolerance, appear to play a significant role in both processes (2). We showed that tumor emergence as well as embryo implantation elicit a strikingly similar brisk Treg response (3),(4), which functional relevance is supported by the fact that and Treg depletion leads to fetus or tumor immune rejection (5),(6). This single observation led us to hypothesize that tumors hijacked mechanisms of tolerance initially selected during evolution of the mammalian immune system to protect fetuses (4). To substantiate this hypothesis, we aimed at a more global comparison of immunotolerance in the two settings. Indeed, the immune system being made of very large sets of diverse, circulating, interconnected cells, and with numerous mediators involved, understanding the global nature of immune responses requires systems approaches. We investigated the fetus and tumor microenvironments using microarray analysis of the entire transcriptome, which is quite well codified and for which there are numerous tools that have been developed to analyze and represent results (7).

We generated a first set of transcriptomic data from the uterus microenvironment of non-pregnant mice and from 4 to 12 days post-fecundation, i.e. E4 to E12 stages of pregnancy. The high quality of the dataset was attested by Principle Variance Component Analysis (fig.S1). We first performed supervised analyses looking at differentially expressed genes (DEGs) in the uterus microenvironment. To minimize false positives, p-values were adjusted by the Benjamini and Hochberg false-discovery-rate (BH-FDR) method with a stringent cutoff of 0.01. In E4-pregnant mice, we could already detect over 2000 genes that are up- or down-

regulated, as compared to non-pregnant mice (fig.1A). This number rapidly increases with time to reach over 6000 regulated genes in E10-E14 pregnant mice.

We then annotated genes involved in immune responses using Ingenuity Pathways Analysis (IPA) and identified 126 significantly (BH-FDR <0.05) regulated immune pathways (fig.1B and fig.S3). Among them, 19 (15%) are up-regulated, although not showing a consistent pattern of regulation over time (fig.1b and fig.S3a). In contrast, 107 (85%) are down-regulated, most of which with a consistent trend for increased down-modulation over time (fig.1c). Down-regulated pathways were subdivided into two main sub-clusters based on statistical significance ( $-\log(p\text{-value})$ ) (fig.S2b-c)). The first cluster contains 32 highly significantly regulated pathways ( $4 < -\log < 8$ ) that are all down-regulated as soon as from E6. As embryo implantation takes place at around E4.5, this suggests that physical contact between the embryo and the uterus is important for triggering immune response modulation. 25 of these pathways (78%) are labeled *signaling*, the 7 others being related to *antigen presentation* or *T lymphocytes*. The second cluster contains 47 pathways that are modulated later, starting at E10/E12 for most of them, and with lower but still highly significant p-values ( $1.5 < -\log < 3.5$ ). These results underline the complexity of the microenvironment changes in the uterus during pregnancy and clearly points to an early down-modulation of immune response triggered by embryo implantation.

Supervised analysis always carries the risk of introducing bias in the representation/interpretation of results. We thus further analyzed our datasets with unsupervised methodologies. We first generated a set of signatures using Independent Component Analysis (ICA) that blindly unravels the complexity of a dataset by identifying “sources” of complexity, i.e. for transcriptomics groups of genes which variations of expression are correlated, and which define signatures. In addition to these signatures

generated from the dataset, we analyzed additional signatures compiled from Gene Ontology (GO) using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)(8). Altogether, we could identify numerous significantly enriched signatures (585 to 817 depending on time in pregnancy) and focused on the highly discriminating ones ( $p$ -values  $<0.005$ ). Using Cytoscape's Enrichment Map (9),(10), we represented them as networks of signatures, in green and red for the down- and up-regulated ones, respectively (fig.2). As early as at E4, two main categories of signatures are modulated (fig.2a). Large groups of signatures categorized as related to (i) *DNA and RNA synthesis*, (ii) *ribosome, proteasome or endoplasmic reticulum* function, and (iii) *metabolism* are up-regulated. They likely represent the intense fetal cells proliferation. The only and few other signatures that are already regulated at E4 are those related to *immune response*, and are all down-regulated. This early down-modulation, which was not detected by the supervised DEGs analysis (fig.1), takes place earlier than embryo implantation and may be triggered by soluble factors or even by sperm cells (11). The early trend for *cell cycle* up-regulation and *immune response* down-regulation is then conserved from E4 to E12, with more numerous immune annotated signatures being down regulated with time (fig.2 b-d). Altogether, these unbiased studies further confirm the importance of the early down-regulation of immune response during pregnancy, and most importantly that this down-modulation affects numerous pathways and functions that can thus only be deciphered by systems biology based analyses.

The GO database does not contain gene-sets specifically annotated as Tregs signatures, while some Tregs signatures are found in the GSEA database. We thus analyzed the dynamic behavior of a previously described Treg signature (12) and found that it was up-regulated as early as E4 and remained so until E12 (Fig. 2B). This confirms previous observation showing that Tregs are briskly recruited at pregnancy onset, and play a major role in maternal-fetal tolerance (MFT). To investigate how changes in the maternal-fetal interface were linked to

Tregs, we mated female mice that were depleted or not of their Tregs, and compared their uterus microenvironment at E12, the time at which changes are maximum (fig.2). Comparison of non-pregnant mice and control pregnant mice showed again a major down-regulation of *immune response* annotated signatures and up-regulation of *cell cycle* and *metabolism* related signatures (fig.3a). In contrast, in Treg depleted pregnant mice that were rejecting their fetuses, the very same immune signatures were markedly up-regulated compared to non-pregnant mice (fig.3 b) testifying of an ongoing effector immune response. Similarly, the comparison between pregnant mice with or without Tregs revealed an up-regulation in Treg-depleted mice of immune related signatures that were down-regulated in the presence of Tregs (fig.3c). Altogether, these results highlight the crucial role of Tregs in orchestrating the tolerant uterus microenvironment of pregnancy.

We earlier showed that embryo or cancer cell implantation led to a remarkably similar brisk recruitment of self-specific activated/memory Tregs (4),(3). To further analyze the similarities of tolerance to fetuses or cancer cells on a more global scale, we compared the changes in the maternal-fetal and tumor microenvironment using global transcriptomics. We generated transcriptome data of the tumor microenvironment collected from day 4 to day 14 after tumor implantation. This tumor dataset first showed a very similar pattern of gene regulation than the one observed in the pregnancy setting. DEGs and unsupervised analyses showed that *cell cycle and metabolism* related signatures are up-regulated while *immune response* annotated signatures are down-regulated as early as day 4 post tumor emergence, with an increased modulation over time (fig.S3). We then compared signatures modulation between the pregnancy and cancer settings (fig.4). The immune response related signatures that are rapidly down-regulated in the pregnancy setting (Fig4a, left panel) are also consistently down-regulated in the cancer setting (fig.4a, right panel). This is also true at later time points, when more immune response associated signatures are down regulated

(fig.4b). At any time points between E4 and E12, there is not even a single down-regulated immune response related signature that is up-regulated in the cancer setting.

We next analyzed all significantly enriched signatures, immune related or not, shared by the two conditions across all time points. We found a total of 37 such signatures (Fig.4c). Strikingly, the 10 up-regulated signatures are all related to *cell cycle*, while all the 27 down-modulated signatures were associated to *immune response*, 10 of these signatures being labeled as related to *antigen presentation*, and 6 being related to *T lymphocytes function*. Among the other signatures, 5 were labeled as related to diseases, all being allo- or auto-immune diseases. These studies reveal the global similarities in the complex immune microenvironment that protect fetuses as well as cancer cells from immune rejection.

To further support the significance of these observations, we performed similarity analyses between up- and down-regulated signatures from the two datasets. The Jaccard and GoSemSim analyses (refs), which test the similarity of signatures in term of gene composition and functional annotation, respectively, confirmed the high significance of our above findings (fig. S4 a,b). We then focused on the signatures that showed the highest Jaccard and GoSemSim indices, which correspond to those with the highest similarity between the cancer and pregnancy settings. Among the up-regulated signatures, they were again those annotated *metabolism* and *cell cycle*. Among the down-regulated ones, they were those associated to *antigen presentation*, *interferon signaling* and *IL17 signaling* (fig.S4c).

Since 1953, pregnancy has been viewed as “Nature’s allograft” (13), the maternal immune system being in direct contact with a semi-allogenic organism, deeply engrafted and invasive, without any sign of rejection. Decades of studies of the MFT enigma have emphasized the numerous cell types and mechanisms involved (2),(14),(15),(16).

As most of these studies were based on reductionist approaches, focusing on individual molecules or cells, our understanding of MFT is still very fragmented. Understanding the global nature of immune responses, such as in MFT, requires studying the individual component involved, but also exploring the complex interactions between these components. Systems biology allowed us going beyond our reductionist knowledge of MFT, highlighting the immense complexity of the mechanisms involved.

Our study highlights that antigen presentation and lymphocyte activation are central down-modulated pathways, which regulation appear orchestrated by Tregs. These results are in line with the importance of the cross talk between Tregs and dendritic cells (DCs) for the maintenance of tolerance (2). Treg-mediated suppression of DC function is mediated at least in part by the interaction of CTLA-4 on Tregs with CD80/ CD86 on the DCs, resulting in down-regulation of CD80/CD86 expression and defective Teff activation (17), (18).

The first viviparous mammals, in between dinosaurs and mammals (19),(20) were faced with the development of a sophisticated adaptive immune system (2). The development of placentation in eutherians involved a series of suppressive mechanisms, of which only a few have been demonstrated to be crucial, including those involving Tregs. We and others have hypothesized that the selection of Treg during evolution, whether natural thymic Tregs (3) or peripheral induced Tregs (21) has been mostly driven by the need to protect the fetus. We now believe that the similarities in the Treg response to tumor or embryo implantation indicate that protection of cancer cells by Tregs became the price paid for an efficient protection of embryos.

## **Acknowledgement**

We are grateful to Wassila Carpentier for the generation of the excellent transcriptomic dataset, and Wahiba Chaara and Hang-Phuong Pham for advices with statistical and bioinformatics methods.

We also thank XXX for critical reading of the manuscript.

This work was supported by a grant from INCA to DK. DNB thesis was partly funded by the CNRS.

## **Author's contribution.**

DNB performed all experiments and analyzed the results. TC, LF and MGR participated to some experiments and ND to data analysis. DK conceived and supervised the study, analyzed data and wrote the first manuscript, which was reviewed by all authors.

## References (30 max)

1. S. G. Holtan, D. J. Creedon, P. Haluska, S. N. Markovic, Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin. Proc.* **84**, 985–1000 (2009).
2. M. G. Ruocco, G. Chaouat, L. Florez, A. Bensussan, D. Klatzmann, Regulatory T-cells in pregnancy: historical perspective, state of the art, and burning questions. *Front Immunol.* **5**, 389 (2014).
3. G. Darrasse-Jèze *et al.*, Tumor emergence is sensed by self-specific CD44<sup>hi</sup> memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2648–2662 (2009).
4. T. Chen *et al.*, Self-specific memory regulatory T cells protect embryos at implantation in mice. *The Journal of Immunology.* **191**, 2273–2281 (2013).
5. V. R. Aluvihare, M. Kallikourdis, A. G. Betz, Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology.* **5**, 266–271 (2004).
6. G. Darrasse-Jèze *et al.*, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol. Lett.* **102**, 106–109 (2006).
7. C. Benoist, R. N. Germain, D. Mathis, A plaidoyer for “systems immunology.” *Immunological reviews.* **210**, 229–234 (2006).
8. A. Subramanian *et al.*, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15545–15550 (2005).
9. P. Shannon *et al.*, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research.* **13**, 2498–2504 (2003).
10. D. Merico, R. Isserlin, O. Stueker, A. Emili, G. D. Bader, Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PloS one.* **5**, e13984 (2010).
11. S. A. Robertson, J. R. Prins, D. J. Sharkey, L. M. Moldenhauer, Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* **69**, 315–330 (2013).
12. M. A. Gavin *et al.*, Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* **445**, 771–775 (2007).
13. P. . Medawar, Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **7**, 320–338 (1953).
14. M. Gobert, J. J. Lafaille, Maternal-fetal immune tolerance, block by block. *Cell.* **150**, 7–9 (2012).

15. A. Erlebacher, Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 23–33 (2013).
16. P. C. Arck, K. Hecher, Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat. Med.* **19**, 548–556 (2013).
17. S. Yamazaki *et al.*, Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 235–247 (2003).
18. P. Serra *et al.*, CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunity.* **19**, 877–889 (2003).
19. J. R. Wible, G. W. Rougier, M. J. Novacek, R. J. Asher, Cretaceous eutherians and Laurasian origin for placental mammals near the K/T boundary. *Nature.* **447**, 1003–1006 (2007).
20. Z.-X. Luo, C.-X. Yuan, Q.-J. Meng, Q. Ji, A Jurassic eutherian mammal and divergence of marsupials and placentals. *Nature.* **476**, 442–445 (2011).
21. R. M. Samstein, S. Z. Josefowicz, A. Arvey, P. M. Treuting, A. Y. Rudensky, Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell.* **150**, 29–38 (2012).

## **Fig 1: Supervised analyses of differentially expressed genes in the uterus**

### **microenvironment during pregnancy.**

A) Barplot describing the number of all differentially expressed genes (DEGs) in pregnant mice at E4, E6, E8, E10, E11 and E12 in comparison to non-pregnant (NP) mice. The significance threshold was set at  $p\text{-value} < 0.01$  (ebayes test). In red, the up-regulated genes and in green the down-regulated ones.

B & C) The DEGs were annotated using IPA and depicted as heatmaps according to their significance level ( $-\log(p\text{-value})$ ). The up-regulated immune associated pathways are represented as in (B) while down-regulated ones are shown in (C). The heatmap colors represent the statistical significance ( $-\log(p\text{-value})$ ) of each pathway and only the pathways showing a ( $-\log(\text{val}) > 1.3$ ) are significantly modulated.

## **Fig2: Unsupervised analyses of the dynamic regulation of pathways in the uterus**

### **microenvironment during pregnancy**

#### *A) Cytoscape representation*

The enrichments of all ICA extracted and GO compiled signatures were tested using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). The significantly enriched signatures (FDR  $p\text{-value} < 0.05$ ) were used to generate functional modules using the Cytoscape software and its Enrichment Map plugin.

Nodes represent molecular signatures and their size is proportional to the number of genes composing the molecular signature; lines connecting nodes reflect mutual overlap between nodes. In Red, up-regulated signatures and in green the down regulated ones.

#### *B) Treg signature*

Heatmap showing the kinetic of a previously described Tregs signature (GAVIN\_FOXP3\_TARGETS\_CLUSTER\_P6) at E4, E6, E8 and E12, compared to non-pregnant mice. In red up-regulated genes and in green down-regulated ones.

### **Fig 3: Effects of Treg depletion on the regulation of pathways in the pregnant uterus microenvironment**

The signature modules were obtained as described in fig.2 and the pathways regulated at E12 are shown. In Red, up-regulated signatures and in green the down regulated ones, and non-shared signatures in gray.

Clusters of functionally related signatures were manually circled and assigned a label (depending on Gene Ontology annotation). Immune associated modules are represented in dotted lines.

A) comparison with non-pregnant mice of Treg depleted (lower panel) or untreated mice (upper panel).

B) comparison between Treg depleted and untreated mice.

### **Fig 4: Comparisons of regulated pathways in the pregnant uterus and tumor microenvironments**

Significantly enriched signatures from FMT (at E6 and E12) settings and tumor microenvironment (at day 4 and day 14) are compared. E6 vs Day 4 (A) and E12 vs Day 14 (B).

In red, up-regulated signatures genes and in green the down-regulated ones.

C) Intersection of all signatures

All signatures significantly enriched (Up or Down-regulated) from tumor microenvironment (at day 4 and day 14) and FMT settings (at E4, E6, E8, E10, E11 and E12) were compared. In red the list of shared up-regulated signatures and in green the down-regulated ones.

## Supplementary data

### Fig. S1: Dataset quality validation

- A) Hierarchical clustering based on normalized gene expression accurately separates non-pregnant mice and those in early or late pregnancy.
- B) Principal Variance Component Analysis (PVCA), which allow to quantify how much of variation changed across variance component, was performed using R package (Bioconductor). Each bar of the histogram represents a percentage of total variability due to an experimenter-known variability source (here; Biological groups, arrays, RNA quality, experimentation date..).

### Fig. S2: Differentially expressed genes in the uterus microenvironment during pregnancy: annotated pathways

DEGs were annotated using IPA and significantly enriched Up- and down-regulated pathways are shown. Given the large number of down-regulated DEGs, the principle cluster were subdivided into two main clusters using a cutTree R package, the first cluster represent the early immune down-regulated pathways and the second one shows the late ones. The heatmap colors represent the statistical significance ( $-\log(p\text{-value})$ ) of each pathway and only the pathways showing a ( $-\log(\text{val}) > 1.3$ ) are considered to be significantly modulated.

### Fig S3: Unsupervised analyses of the dynamic regulation of pathways in the tumor microenvironment

The enrichments of all ICA extracted and GO compiled signatures were tested using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). The significantly enriched signatures (FDR  $p\text{-value} < 0.005$ ) were used to generate functional modules using the Cytoscape software and its Enrichment Map plugin.

Nodes represent molecular signatures and their size is proportional to the number of genes composing the molecular signature; lines connecting nodes reflect mutual overlap between nodes. In Red, up-regulated signatures and in green the down regulated ones.

(A) day 4 and (B) day 14 after B16 tumor injection.

**Fig.S4: FMT and tumor microenvironment specific signatures comparison using similarity measures**

ICA-extracted molecular signatures from B16 tumor microenvironment and FMT settings were compared using Jaccard index “Ji” (gene to gene similarity measure) and GoSemSim index “GSSi” (functional annotation similarity measure).

Four heatmaps were generated using the similarity indexes between down-regulated signatures using GSS (A) or Ji (C) and up-regulated ones using GSSi (B) or Ji (D).

The signatures with the highest GSSi and Ji are represented in yellow for cancer and red for uterus microenvironments using the Cytoscape software (E). Linked signatures were then annotated using GO.

# Materials and methods

## Animals

BALB/c and C57BL/6 mice, 6–8-weeks of age, were obtained from Elevage Janvier (Le Genest St Isle, France). All mice were treated in accordance with the European Union guidelines for animal experimentation.

## Cell lines

For tumor experiments, a total of  $5 \times 10^5$  B16 (melanoma, C57BL/6 background) were injected subcutaneously into the right flank of the mice. Tumor-inoculated mice were sacrificed when average tumor diameters reached 15–20 mm. Tumor volume (mm<sup>3</sup>) was determined by measuring perpendicular tumor diameters using Vernier calipers ( $V = (L \times l^2)/2$ ).

## Visual observation of mating and pregnancy outcome

The sighting of a vaginal plug was denoted as days postcoitum (dpc) 0.5. Female mice were sacrificed from days postimplantation (dpi) 8–12, and the numbers of viable fetuses (F) and resorbed fetuses (R) were recorded visually. Resorbed fetuses are smaller and usually hemorrhagic compared with viable ones.

Resorption frequency was calculated as follows:  $\text{resorption \%} = R/(R + F)$ .

## Gene expression analyses

Total RNA from uterus (pregnant and non-pregnant), tumor and PBS-injected mice microenvironments were purified using Trizol (Invitrogen) and according to the manufacturer's instructions.

RNA yield was assessed using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (NanoDrop Products, Thermo Fisher Scientific). RNA integrity was assessed using an Agilent Bioanalyser showing a quality RNA integrity number of 8–10 (Agilent Technologies). The RNA was processed using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit Protocol according to manufacturer's protocol.

Briefly, labelled cRNA were hybridized overnight to Illumina MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChips arrays. The arrays were then washed, blocked, stained and scanned on an Illumina BeadStation following the manufacturer's protocols. Illumina BeadStudio software (Illumina) was used to generate signal intensity values from the scans. Genes were filtered out from the analysis if their expression was below the detection limit ( $p\text{-value} < 0.05$ ) in at least 2 out of 3 samples in both microenvironment and control groups. Next, data were normalized according to the quantile method using limma R package.

The limma package was used to identify differentially expressed genes ( $p\text{-FDR} < 0.05$ ) at day 4 and 14 (tumor microenvironment) or E4, E6, E8, E10 and E12 (fetomaternal interface).

<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>

### **Dataset quality validation**

Hierarchical clustering was performed using ...

Principal Variance Component Analysis (PVCA) was performed using R package version 1.4.0.

Bushel P (2013). <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/pvca.html>

### **Identification of specific molecular signatures**

Specific molecular signatures were generated using Independent Component Analysis (ICA) and their enrichment significance were tested with gene set enrichment analysis (GSEA) as described in (1).

### **Independent Component Analysis (ICA)**

The CRAN package fastICA (2) was used to carry out the ICA.

ICA was performed on the expression profiles of the cancer and fetomaternal samples.

Following the recommendation of Chiappetta et al. (3), we selected, for each average source generated, two potential signatures corresponding to the tails of the super-Gaussian distribution ( $|Sg| > 3\sigma$ ).

## **Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)**

Probe sets were formatted into gmt file, a GSEA input file format. Since sample numbers in each condition were not high enough for the phenotype permutation - 8 - option, we followed the developers' recommendations to use the gene set permutation type. The number of permutation was set to 1000. Probes were sorted following the score of eBayes algorithm from limma package and inputted in GSEA program as a pre-ranked list rnk files. We used the weighted scoring scheme to compute the enrichment score. A FDR q-value, indicating the probability of false positive score, is computed from the normalized enrichment score (NES). Of note, the FDR and NES were calculated based on a database of 2700 potential signatures. A detailed explanation of GSEA can be found in Subramanian et al. (4) and Mootha et al (5). Typically, GSEA results are considered significant when p-value<0.01 and q-value<0.05.

## **Generation of functional modules of molecular signatures**

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (4) as visualized in Cytoscape (6) (version 2.8.3), and the Enrichment Map software (7), were used to identify the biological processes discriminating pregnant mice groups (E4 to E12) from non pregnant ones as control ( and tumor injected groups from control group). Molecular signatures were compiled from ICA generated signatures database (from our laboratory) and Gene Ontology (GO) databases. GSEA analysis was performed using gene-set permutations with a FDR cut-off of 0.05 and p-value cut-off of 0.01. Clusters of functionally related signature were manually circled and assigned a label (modules). The functional network was manually curated removing general and uninformative sub-networks and nodes, resulting in a simplified network map shown in fig.2 and fig.S3.

The enrichment map was generated using only the gene-sets passing the following thresholds: nominal p-value= 0.01, FDR < 0.05. The overlap coefficient was set to 0.8.

## Similarity measure

In order to compare tumor microenvironment and FMT signatures, we used Jaccard and GoSemSim similarity indexes. The Jaccard index( $J_i$ ) is calculated as described in (8).  $J_i = [\text{size of (A intersect B)}] / [\text{size of (A union B)}]$ .

GoSemSim index is described in (9) and released under the GNU General Public License within Bioconductor project, and freely available at:

<http://bioconductor.org/packages/2.6/bioc/html/GOSemSim.html>.

## In vivo depletion of CD4+ CD25+ T cells

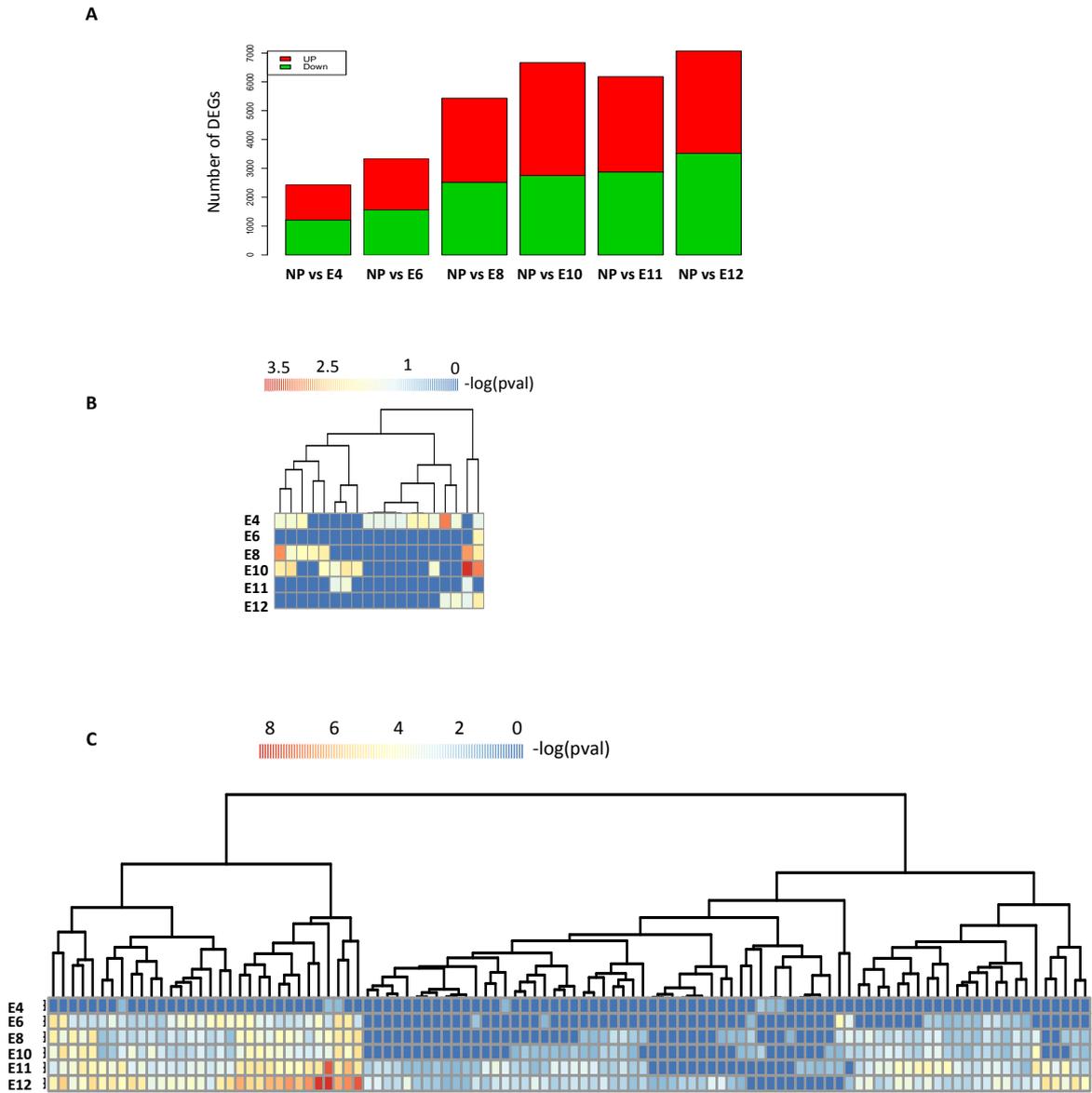
Treg in vivo depletion was performed by intraperitoneal injection of 125 mg of an anti-CD25 monoclonal Ab (PC61) the day before tumor inoculation. This induces a > 80% transient depletion of CD25<sup>high</sup> cells for around 4 weeks in LNs of normal mice.

## Statistical methods

Statistical significances were evaluated using GraphPad Prism software (GraphPad Software). Data are presented as mean  $\pm$  SD, unless otherwise indicated. A p-value 0.05 was considered statistically significant. For some experimental groups with nonmatching time points, unpaired t-tests with Welch's correction were used to compare groups with pooled time points.

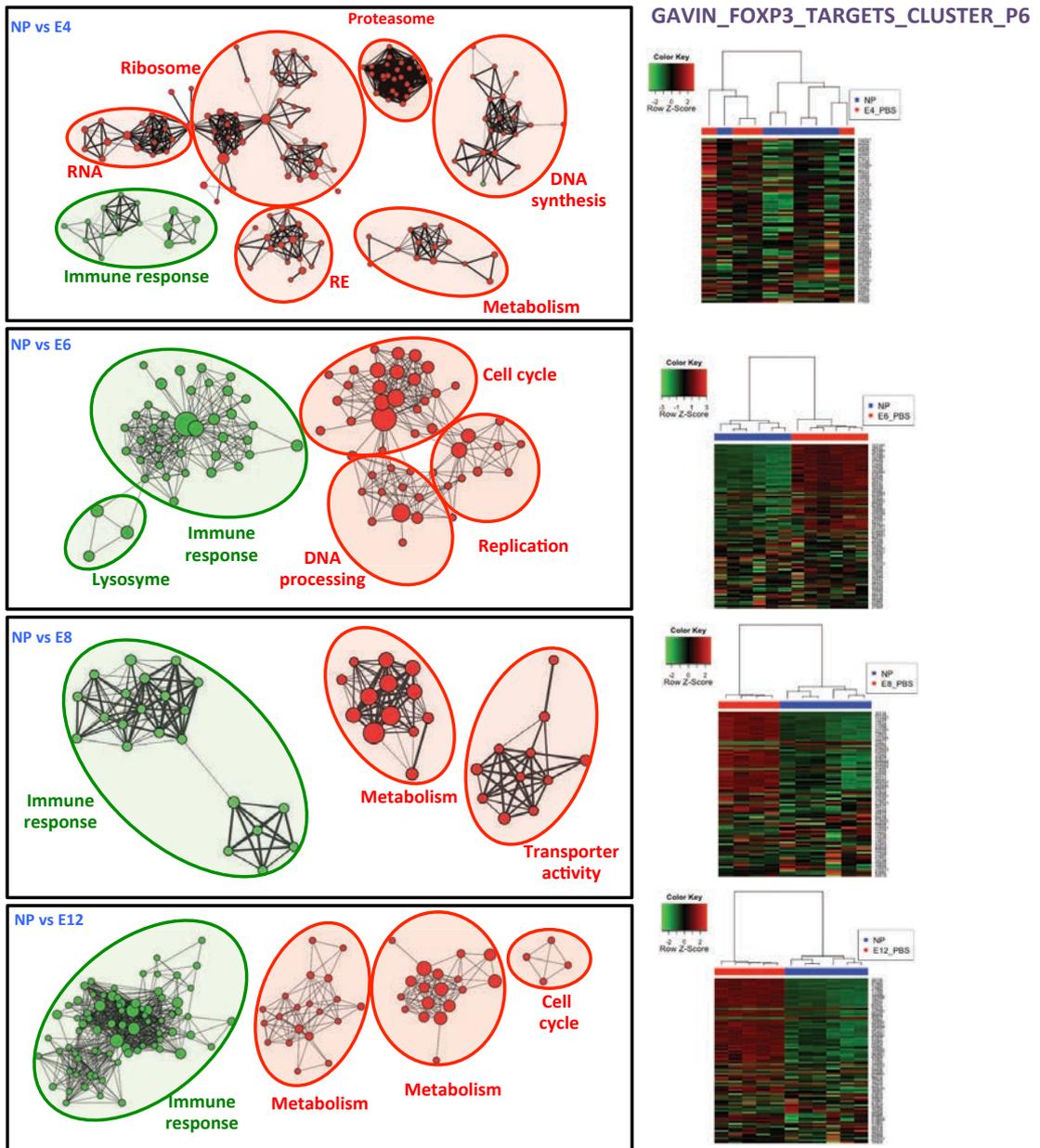
## Reference (Materials and methods)

1. H.-P. Pham *et al.*, A novel strategy for molecular signature discovery based on independent component analysis. *International Journal of Data Mining and Bioinformatics*. **9**, 277–304 (2014).
2. A. Hyvärinen, E. Oja, Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Netw.* **13**, 411–430 (2000).
3. P. Chiappetta, M. C. Roubaud, B. Torrèsani, Blind source separation and the analysis of microarray data. *J. Comput. Biol.* **11**, 1090–1109 (2004).
4. A. Subramanian *et al.*, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15545–15550 (2005).
5. V. K. Mootha *et al.*, PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–273 (2003).
6. P. Shannon *et al.*, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. **13**, 2498–2504 (2003).
7. D. Merico, R. Isserlin, O. Stueker, A. Emili, G. D. Bader, Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS one*. **5**, e13984 (2010).
8. P. Jaccard, *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* (1901), vol. 37.
9. G. Yu *et al.*, GOSemSim: an R package for measuring semantic similarity among GO terms and gene products. *Bioinformatics*. **26**, 976–978 (2010).



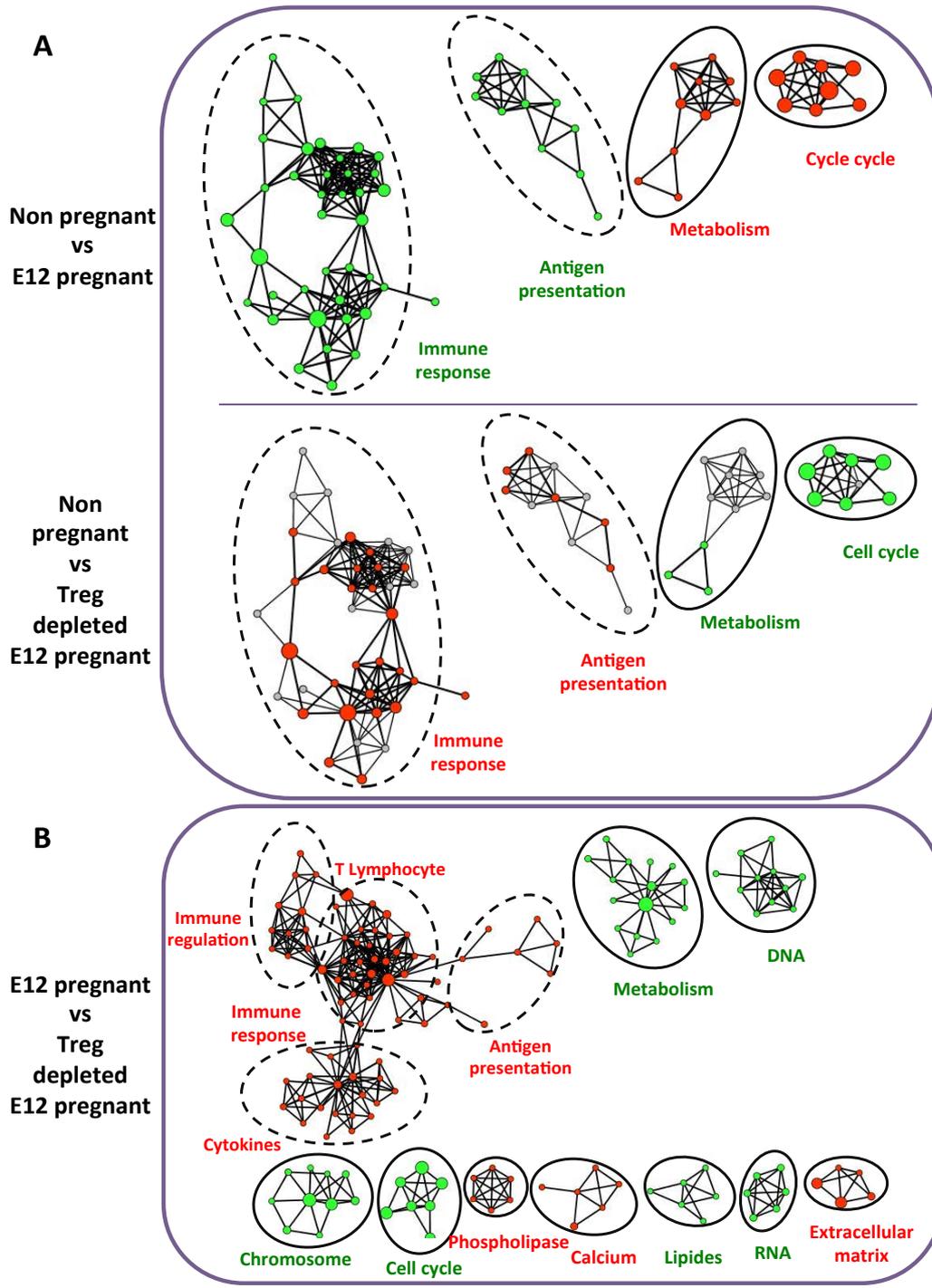
*NEHAR-BELAID et al*

**Fig.1. Supervised analyses of differentially expressed genes in the uterus microenvironment during pregnancy.**



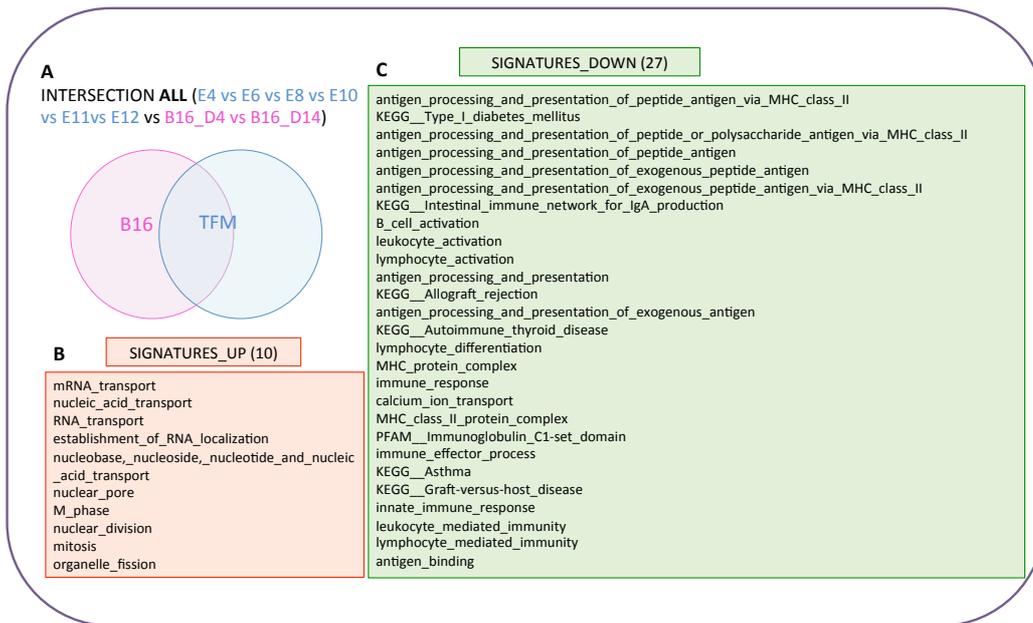
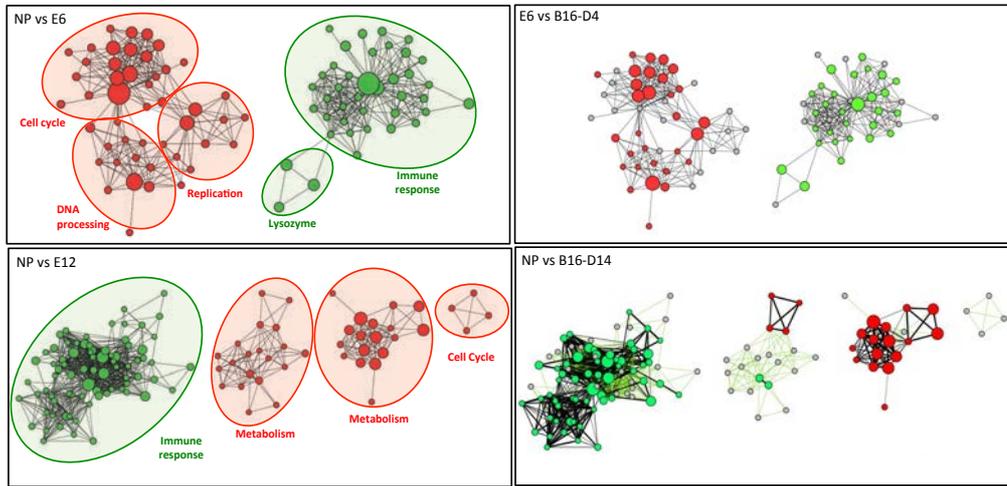
*NEHAR-BELAID et al*

**Fig.2. Unsupervised analyses of the dynamic regulation of pathways in the uterus microenvironment during pregnancy**



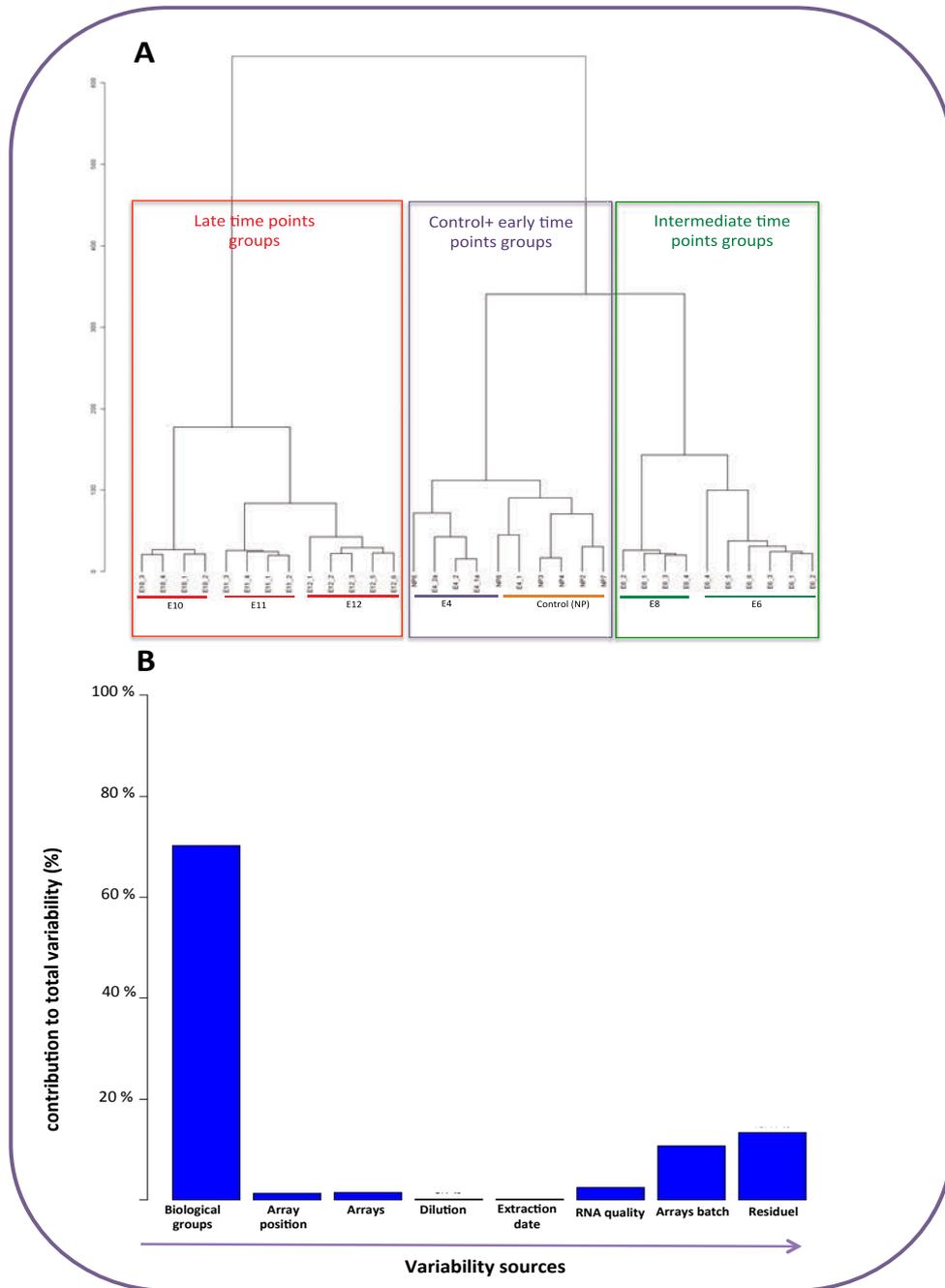
NEHAR-BELAID *et al*

Fig.3. Effects of Treg depletion on the regulation of pathways in the pregnant uterus microenvironment



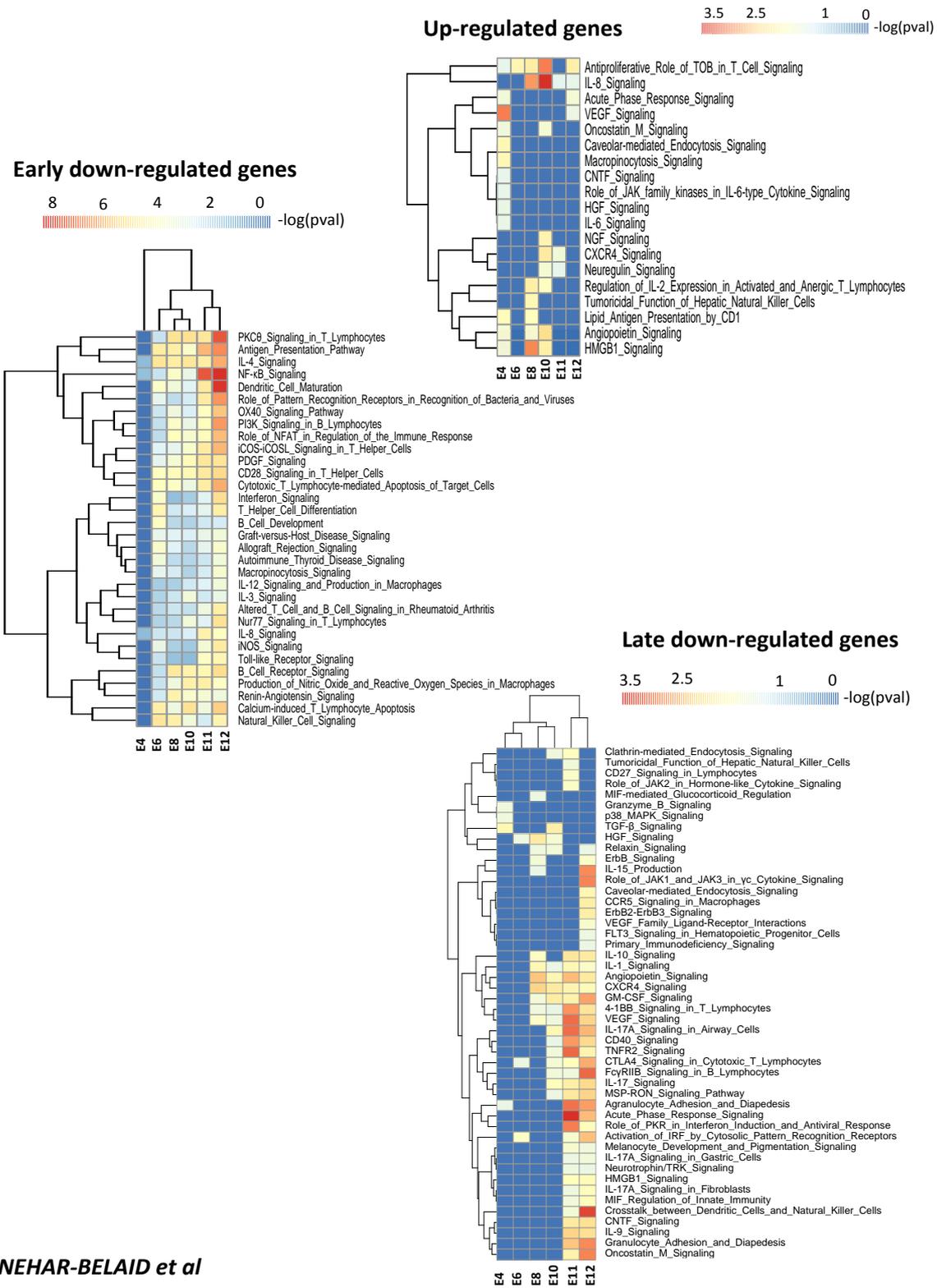
**NEHAR-BELAID et al**

**Fig.4. Comparisons of regulated pathways in pregnant uterus and tumor microenvironments**



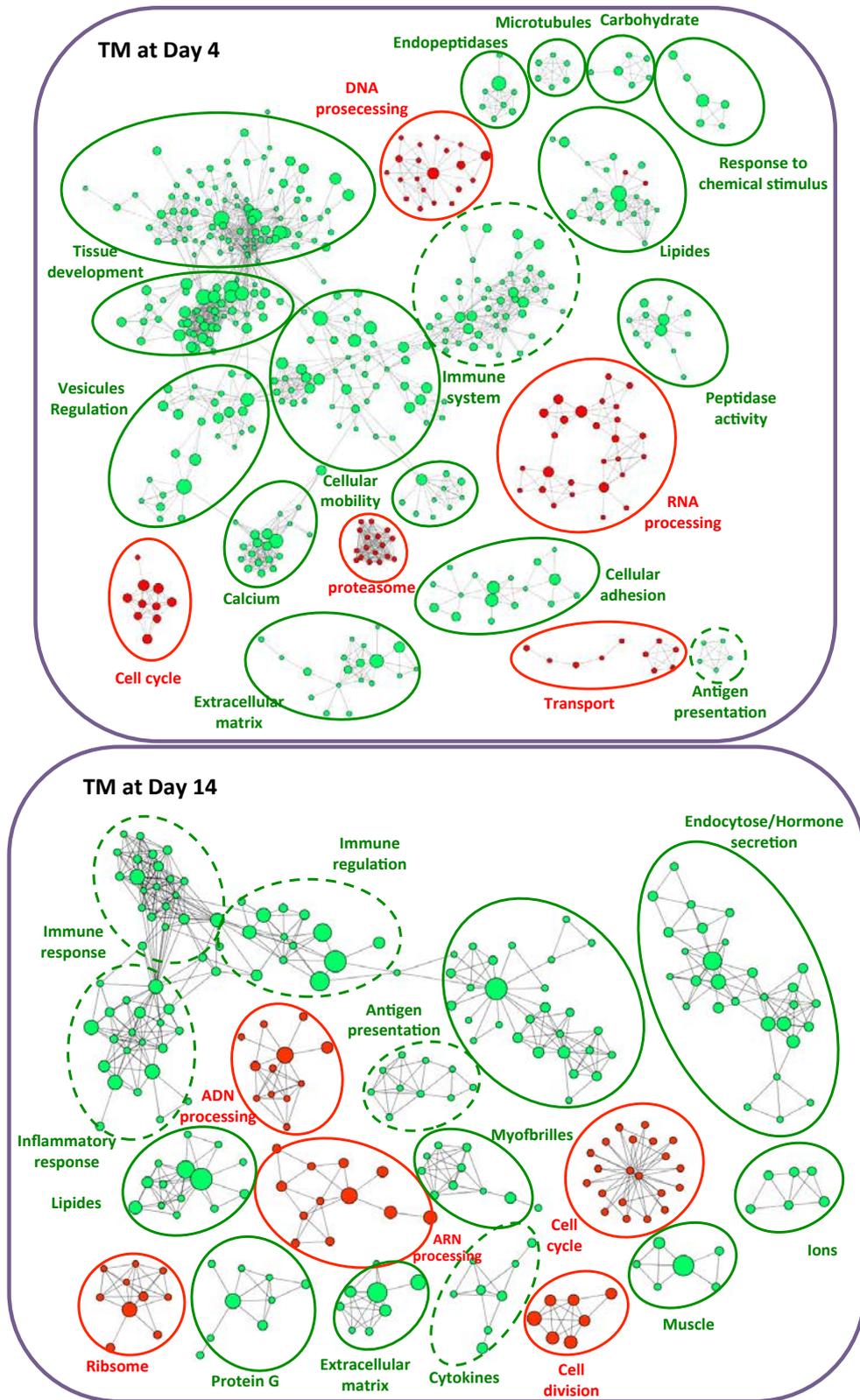
*NEHAR-BELAID et al*

**Fig. S1. Dataset quality validation**



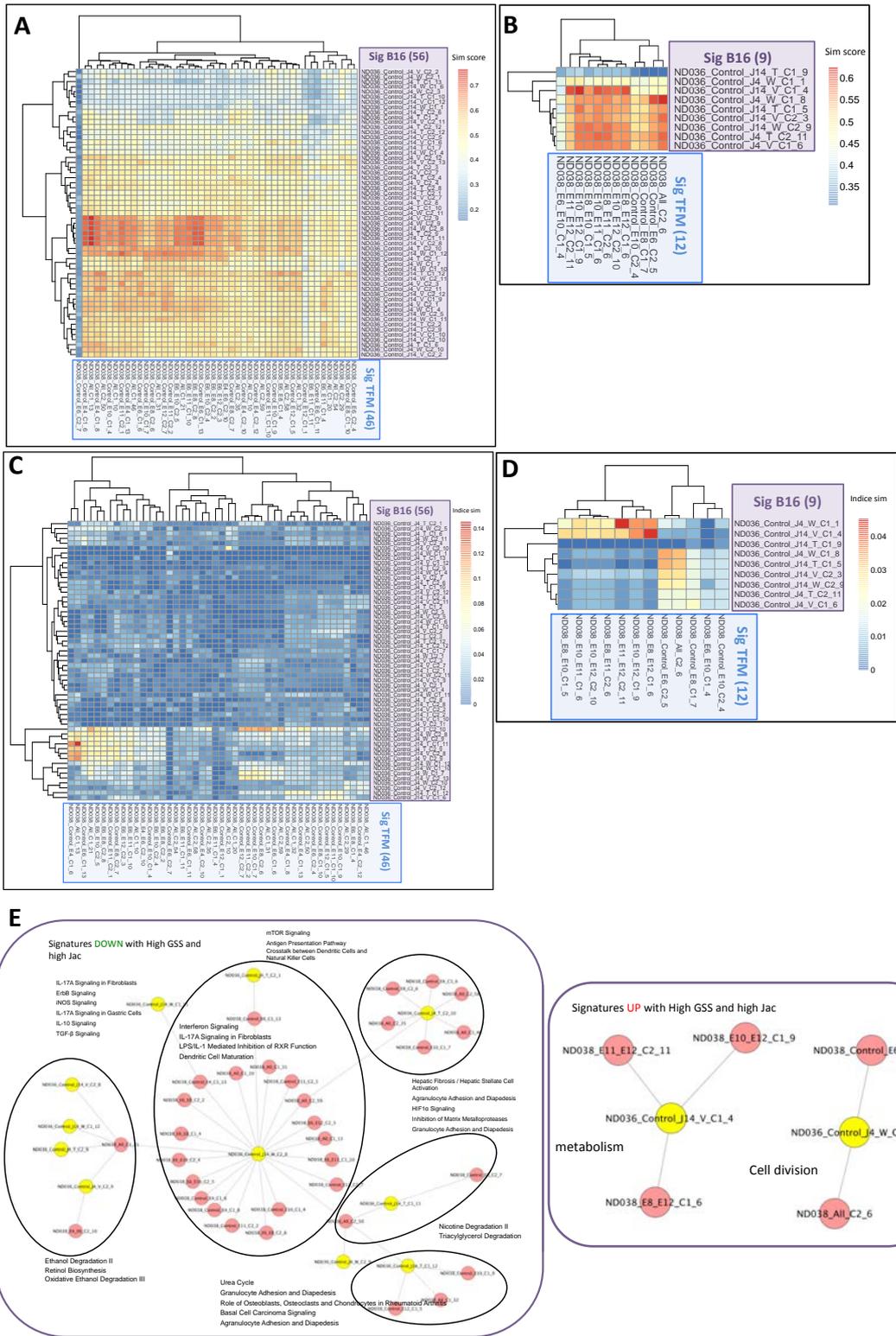
NEHAR-BELAID et al

Fig.S2. Differentially expressed genes in the uterus microenvironment during pregnancy: annotated pathways



**NEHAR-BELAID et al**

**Fig.S3. Unsupervised analyses of the dynamic regulation of pathways in the tumor microenvironment**



**NEHAR-BELAID et al**

**Fig.S4. FMT and tumor microenvironment specific signatures comparison using similarity measures**

## VII. LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. INCIDENCE DE CANCERS INDUITS OU SPONTANES CHEZ DES SOURIS PRESENTANT DIFFERENTS DEFICITS IMMUNITAIRES. ....	23
TABLEAU 2. NOMBRE DE GDE SIGNIFICATIVEMENT ENRICHIES AU SEIN DE CHAQUE CONDITION (CTRL vs.E4, CTRL vs.E6, CTRL vs.E8, CTRL vs.E10, CTRL vs.E11, CTRL vs.E12).....	117
TABLEAU 3. NOMBRE DE SIGNATURES MOLECULAIRES SIGNIFICATIVEMENT ENRICHIES AU SEIN DE CHAQUE CONDITION (CTRL vs. E4, CTRL vs. E6, CTRL vs. E8, CTRL vs. E10, CTRL vs. E11, CTRL vs. E12). ....	120

## VIII. TABLE DES FIGURES

FIGURE 1. LES CARACTERISTIQUES DES CELLULES TUMORALES.....	11
FIGURE 2. COMPARAISON ENTRE LE STROMA A L'ETAT NORMAL ET UN MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	19
FIGURE 3. CONCEPT D'IMMUNO-EDITION (THEORIE DES 3E).....	26
FIGURE 4. SEPTIEME CARACTERISTIQUE DU CANCER : L'ECHAPPEMENT A L'IMMUNO-SURVEILLANCE.....	27
FIGURE 5. LES EVENEMENTS PRECOCES DURANT L'EMERGENCE DE LA TUMEUR CONDUISENT A UNE TOLERANCE DES CELLULES TUMORALES.....	36
FIGURE 6. SIMILARITES ENTRE L'INTERFACE FCETO-MATERNELLE ET LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	41
FIGURE 7. ILLUSTRATION DE LA NOTION DE « PAYSAGE EPIGENETIQUE».....	46
FIGURE 8. VISION REDUCTIONNISTE VS. VISION SYSTEMIQUE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	49
FIGURE 9. META-ANALYSE DES PUBLICATIONS « BIOLOGIE DES SYSTEMES » DURANT LA PERIODE 2001→2009.....	50
FIGURE 10. PROCESSUS EXPERIMENTAUX DANS LA BIOLOGIE CLASSIQUE (OU APPROCHE REDUCTIONNISTE) VERSUS BIOLOGIE DES SYSTEMES.....	51
FIGURE 11. PRINCIPE DES PUCES ILLUMINA : DES BILLES SUR LESQUELLES SONT ATTACHEES LES SONDAS SONT DISPENSEES ALEATOIREMENT SUR UNE LAME.....	56
FIGURE 12. CONTROLE QUALITE DES ECHANTILLONS EN UTILISANT L'ACP (ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES) ET PVCA (PRINCIPAL VARIANCE COMPONENT ANALYSIS).....	59
FIGURE 13. PROCESSUS DE PRE-TRAITEMENT DES DONNEES.....	62
FIGURE 14. LA STRATEGIE ICA→GSEA.....	66
FIGURE 15. EXTRAIT DU GRAPHE ORIENTE ACYCLIQUE DE GENE ONTOLOGY (GO).....	69
FIGURE 16. EXEMPLE DE FIGURE PRODUITE EN UTILISANT L'INTERFACE CYTOSCAPE, AVEC LE PLUGIN ENRICHEMENT MAP.	72
FIGURE 17. EXEMPLE DE RESEAU PRODUIT GRACE A L'OUTIL CLUEGO.....	73
FIGURE 18. STRATEGIE GLOBALE D'ANALYSE D'UN JEU DE DONNEES TRANSCRIPTOMIQUE.....	78
FIGURE 19. GDE A J4 ET J14 AU NIVEAU DU MICROENVIRONNEMENT.....	82
FIGURE 20. ENSEMBLE DES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNOLOGIQUES MODULEES AU NIVEAU DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL B16-WT A J4 ET J14.....	84
FIGURE 21. ENSEMBLE DES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNOLOGIQUES SIGNIFICATIVEMENT MODULEES AU NIVEAU DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL B16-WT A J4 ET J14.....	85
FIGURE 22. ETAT DE MODULATION DES 10 PREMIERES VOIES IMMUNOLOGIQUES SIGNIFICATIVEMENT ENRICHIES AU NIVEAU DES GDE A J4 ET J14.....	86
FIGURE 23. ETAT DE MODULATION D'UNE FONCTION IMMUNOLOGIQUE EN FONCTION DE LA VALEUR STATISTIQUE DES GDE (A J4 ET J14) QUI LA COMPOSENT.....	87
FIGURE 24. ETAT DE MODULATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'INTERFERON- $\gamma$ EN FONCTION DE LA VALEUR STATISTIQUE DES GDE AU NIVEAU DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL A J4 ET J14.....	87
FIGURE 25. SIGNATURES MOLECULAIRES A J4 ET J14 AU NIVEAU DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	88
FIGURE 26. RESEAU DE MODULES FONCTIONNELS DE SIGNATURES MOLECULAIRES REPRESENTANTS LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL « B16 » A J4 ET J14.....	90
FIGURE 27. QUANTIFICATION RELATIVE PAR PCR QUANTITATIVE DES TRANSCRITS ISSUS DU MICROENVIRONNEMENT B16- WT.....	91
FIGURE 28. CROISSANCE TUMORALE MESUREE A JOUR 4 ET JOUR 14 APRES L'INJECTION DE CELLULES TUMORALES.....	93

FIGURE 29. ANALYSE DESCRIPTIVE DES GDE ISSUS DES COMPARAISONS (CTRL vs B16- shVEGF OU -shTGF) A J4 ET A J14. ....	94
FIGURE 30. ENSEMBLE DES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNOLOGIQUES SIGNIFICATIVEMENT MODULEES AU NIVEAU DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL (B16, shVEGF ET shTGF) A J4 ET J14. ....	96
FIGURE 31. ETAT DE MODULATION D'UNE FONCTION IMMUNOLOGIQUE EN FONCTION DE LA VALEUR STATISTIQUE DES GDE (A J4 ET J14) QUI LA COMPOSENT. ....	97
FIGURE 32. ANALYSE DESCRIPTIVE DES SIGNATURES ISSUES DE (B16-shVEGF ET B16-shTGFb). ....	98
FIGURE 33. RESEAUX DE MODULES FONCTIONNELS DE SIGNATURES MOLECULAIRES REPRESENTANTS LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL « B16-shVEGF » ET « B16-shTGF» A J4 ET A J14 APRES INJECTION DE CELLULES TUMORALES. ....	99
FIGURE 34. COMPARAISON DES RESEAUX FONCTIONNELS DU MICROENVIRONNEMENT DES TUMEURS INVALIDEES (« B16-shVEGF » ET « B16-shTGF») AU RESEAU DES TUMEURS SAUVAGES (B16-WT). ....	100
FIGURE 35. AUTOMATISATION DU COMPTAGE DU NOMBRE DE SIGNATURES ASSOCIEES A DES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNOLOGIQUE. ....	101
FIGURE 36. ENRICHISSEMENT IMMUNOLOGIQUE PARMI LES SIGNATURES MOLECULAIRES GENEREES A PARTIR DES JEUX DE DONNEES COMPARANT LES TUMEURS B16-WT AU B16-shVEGF ET B16-shTGF. ....	102
FIGURE 37. ANALYSE DESCRIPTIVE DES GDE DANS LES GANGLIONS A J2, J4 ET J14. ....	103
FIGURE 38. ENSEMBLE DES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNOLOGIQUES SIGNIFICATIVEMENT MODULEES AU NIVEAU DES GANGLIONS TUMORAUX A J2, J4 ET J14 APRES INJECTION DE CELLULES TUMORALES. ....	105
FIGURE 39. ANALYSE DESCRIPTIVE DES GDE DANS LES GANGLIONS A J2, J4 ET J14. ....	106
FIGURE 40. ENSEMBLE DES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNOLOGIQUES SIGNIFICATIVEMENT MODULEES AU NIVEAU DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL A J2, J4 ET J14. ....	107
FIGURE 41. ANALYSE DESCRIPTIVE DES SIGNATURES DANS LES GANGLIONS A J2, J4 ET J14. ....	108
FIGURE 42. RESEAU DE MODULES FONCTIONNELS DE SIGNATURES MOLECULAIRES REPRESENTANTS LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL « AB1 » A JOUR 2, 4 ET 14 APRES INJECTION DE CELLULES TUMORALES. ....	110
FIGURE 43. HEATMAP REPRESENTANT DEUX SIGNATURES MOLECULAIRES D'INTERET. ....	111
FIGURE 44. CINETIQUE DE CROISSANCE TUMORALE (AB1) DES SOURIS SAUVAGES (WT) ET SOURIS STAT1-KO. ....	112
FIGURE 45. ANALYSE DE VARIABILITE DU JEU DE DONNEES IFM. ....	116
FIGURE 46. ANALYSE DESCRIPTIVE DES GDE AU NIVEAU DE L'INTERFACE FCETO-MATERNELLE A E4, E6, E8, E10, E11 ET E12. ....	118
FIGURE 47. ENSEMBLE DES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNOLOGIQUES SIGNIFICATIVEMENT MODULEES AU NIVEAU DE L'IFM A E4, E6, E8, E10, E11 ET E12. ....	119
FIGURE 48. ANALYSE DESCRIPTIVE DES SIGNATURES AU NIVEAU DE L'INTERFACE FCETO-MATERNELLE A E4, E6, E8, E10, E11 ET E12. ....	120
FIGURE 49. RESEAU DE MODULES FONCTIONNELS DE SIGNATURES MOLECULAIRES REPRESENTANTS LE L'INTERFACE FCETO-MATERNEL A JOUR 4, 6, 8, 10, 11 ET 12 APRES IMPLANTATION DU FCETUS. ....	122
FIGURE 50. COMPARAISON DES GDE IFM VS. CANCER. ....	123
FIGURE 51. COMPARAISON DES RESEAUX FONCTIONNELS DU MICROENVIRONNEMENT DES TUMEURS B16-WT A J4 AU RESEAU IFM (E6) ET INVERSEMENT. ....	125
FIGURE 52. COMPARAISON DES RESEAUX FONCTIONNELS DU MICROENVIRONNEMENT DES TUMEURS B16-WT A J14 AU RESEAU IFM (E12) ET INVERSEMENT. ....	126

FIGURE 53. INTERSECTION ENTRE TOUTES LES SIGNATURES MOLECULAIRES GENEREES A PARTIR DES JEUX DE DONNEES CANCER, B16-WT ET IFM.....	127
FIGURE 54. SIMILARITES ENTRE LES SIGNATURES MOLECULAIRE CANCER ND036 (B16) vs. SIGNATURES DE L'IFM (ND038).....	129
FIGURE 55. RESEAU DE MODULES FONCTIONNELS DE SIGNATURES AYANT UN FORT GSS ET UN FORT JACCARD. ....	130
FIGURE 56. MODULE IMMUNOLOGIQUE DE SIGNATURES GO AU NIVEAU DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL AB1 A JOUR 4. .....	138
FIGURE 57. ANNOTATION FONCTIONNELLE DE LA SIGNATURE « <i>NEGATIVE REGULATION OF RESPONSE TO STIMULUS</i> ».....	138
FIGURE 58. TAUX DE REJET DE TUMEURS SUITE A UNE ELIMINATION DE CELLULES TREGS DANS DIFFERENTS MODELES TUMORAUX. ....	140
FIGURE 59. LA THEORIE DES 3E (IMMUNO-EDITION) REVISITEE. ....	141
FIGURE 60. ROLE DU TGF $\beta$ ET DU VEGF DANS L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE. ....	145
FIGURE 61. COMPARAISON GDE DES IFM VS B16 POUR DEUX FONCTIONS IMMUNITAIRES (« T CELL RESPONSE, » ET « B CELL DEVELOPMENT »).....	154
FIGURE 62. CELLULES TREGS AU NIVEAU DE L'UTERUS, GANGLIONS ET RATE.....	157
FIGURE 63. EFFET DE LA DEPLETION DES TREGS SUR LE TAUX DE REJET DE FCETUS CHEZ LA SOURIS A E12.....	157
FIGURE 64. RESEAUX DE MODULES FONCTIONNELS DE SIGNATURES MOLECULAIRES AU NIVEAU DE L'IFM APRES ELIMINATION DES TREGS A E12. ....	158
FIGURE 65. COMPARAISON DES RESEAUX DE MODULES FONCTIONNELS DE SIGNATURES MOLECULAIRES AU NIVEAU DE L'IFM APRES ELIMINATION OU NON DES TREGS A E12.....	159

**Résumé :**

Il existe de nombreuses similarités entre le développement du fœtus et celui des cellules tumorales. En effet, dans les deux cas ils requièrent une division cellulaire intense, une invasion des tissus de l'hôte ainsi qu'une vascularisation soutenue. De plus, malgré le fait que le fœtus et les cellules tumorales expriment à la fois des antigènes étrangers (les antigènes paternels pour le fœtus et les antigènes du soi modifiés au niveau des cellules tumorales) ils ne sont pas rejetés par le système immunitaire.

Parmi plusieurs populations cellulaires impliquées dans ce phénomène de non rejet ou de tolérance, les cellules T régulatrices (Tregs) jouent un rôle primordial dans les deux processus. En effet, notre laboratoire a démontré que l'émergence des cellules tumorales ainsi que l'implantation fœtale s'accompagnent d'une activation forte et rapide des Tregs. Cette observation prend tout son sens quand l'élimination de ces Tregs a conduit à un rejet immunitaire de la tumeur ou du fœtus.

Afin de valider ces observations, nous avons mis au point une étude transcriptomique comparative entre le microenvironnement tumoral et l'interface fœto-maternelle. Cela a révélé une forte similarité et une importante diminution des voies de signalisation immunologiques associées à la présentation antigénique et à l'activation des cellules T. De plus, des analyses non supervisées ont mis en évidence une coévolution des signatures immunitaires inhibées et cela dès les premiers jours suivant l'implantation des tumeurs ou du fœtus. Par ailleurs, l'élimination des Tregs (qui a conduit un rejet de la tumeur ou du fœtus) a permis de faire basculer les mêmes signatures immunitaires d'un état d'inhibition à un état d'activation.

En définitive, nous pensons que les mécanismes déployés au cours de l'évolution pour protéger les fœtus du rejet immunitaire sont détournés afin de favoriser le développement des cellules tumorales.

**Mots clés :** Microenvironnement tumoral, interface fœto-maternelle, Tolérance, Tregs , Biologie des systèmes, transcriptome.

## **Systems immunology to the study of the tumour microenvironment and the feto-maternal interface**

**Abstract:**

There are striking similarities between fetus and tumor development. They both require intense cell division, invasion of host tissues and sustained vascularization. Moreover, despite that fetus and tumor express foreign antigens - paternal allo-antigens for fetuses and modified auto-antigens for tumors - they are not rejected by the immune system.

Among others, regulatory T cells (Tregs), which are key players in tolerance, appear to play a significant role in both processes

We showed that tumor emergence as well as embryo implantation elicit a strikingly similar brisk Treg response, which functional relevance is supported by the fact that and Treg depletion leads to fetus or tumor immune rejection.

Comparison of fetal and tumor microenvironments through transcriptomics revealed strikingly similar and dramatic decrease in expression of multiple immune-related pathways, including antigen presentation and T cell response. Unsupervised analyses highlighted the co-evolution in time of down-regulated immune signatures, from the very first days after tumor or embryo implantation. Treg depletion, which leads to fetus or tumor rejection, converted the very same down-modulated immune signatures to up-regulated ones. We propose that means selected during evolution to protect mammalian fetuses are hijacked to license tumor development.

**Keywords:** Tumor microenvironment, Feto-maternal interface, Tolerance, Tregs, Systems Biology, transcriptomics