

Évaluation de l'expression et de la valeur pronostique de PD-L1 dans les cancers colorectaux traités par chirurgie première : série rétrospective de 105 cas

Gratiane Cogniet

▶ **To cite this version:**

Gratiane Cogniet. Évaluation de l'expression et de la valeur pronostique de PD-L1 dans les cancers colorectaux traités par chirurgie première : série rétrospective de 105 cas. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01271807

HAL Id: dumas-01271807

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01271807

Submitted on 9 Feb 2016

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

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

Université Bordeaux 2 – Victor Segalen

U.F.R DES SCIENCES MEDICALES

Année 2016 Thèse n° 3003

Thèse pour l'obtention du

DIPLÔME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 janvier 2016

Par Gratiane CHATELIN COGNIET

Née le 23 Septembre 1984 à Courbevoie

EVALUATION DE L'EXPRESSION ET DE LA VALEUR PRONOSTIQUE DE PD-L1 DANS LES CANCERS COLORECTAUX TRAITES PAR CHIRURGIE PREMIERE

Série rétrospective de 105 cas

Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Dominique BECHADE

Rapporteur de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Frédéric BLANC

Membres du jury

Monsieur le Professeur Alain RAVAUD……Président

Monsieur le Professeur Jean-Frédéric BLANC……Juge

Madame le Professeur Béatrice VERGIER……Juge

Madame le Docteur Isabelle SOUBEYRAN……Juge

Monsieur le Professeur Dominique BECHADE……Juge

REMERCIEMENTS

A notre Président du Jury

Monsieur le Professeur Alain RAVAUD.

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Chef de service d'oncologie médicale, CHU de Bordeaux

Je vous remercie de l'honneur que vous nous faites de présider le jury de cette thèse. Je vous suis reconnaissante pour tout ce que m'avez transmis durant ces années d'internat, tant sur le plan humain que scientifique, la qualité de votre enseignement et l'intérêt que vous portez à chacun de vos internes. Merci pour vos nombreux conseils.

Veuillez trouver ici l'expression de mon admiration et de mon profond respect.

A notre Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Dominique BECHADE

Professeur agrégé du Val de Grâce – Praticien Hospitalier

Service d'oncologie médicale, Institut Bergonié, Bordeaux

Merci de m'avoir confié ce travail. Travailler à tes cotés fut une expérience très enrichissante. Ton savoir-faire, et ta rigueur sont un exemple.

Sois assuré de mon respect le plus sincère et de ma profonde reconnaissance.

A notre rapporteur de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Frédéric BLANC

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Service d'hépato-gastro-entérologie, CHU de Bordeaux

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à vous témoigner toute ma gratitude et mon profond respect.

A nos Membres du Jury

Madame le Professeur Béatrice VERGIER

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Service d'anatomie et cytologie pathologiques, CHU de Bordeaux

Je suis très touchée de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger cette thèse.

Veuillez trouver par ce travail, l'expression de ma haute considération et de mon profond respect.

Madame le Docteur Isabelle SOUBEYRAN

Praticien Hospitalier

Service de d'anatomie et cytologie pathologiques, Institut Bergonié, Bordeaux

Merci de votre aide si précieuse pour ce travail et l'originalité du sujet. Je vous remercie pour les nombreuses heures que vous y avez consacrées avec moi et qui ont permis de mener à bien ce projet. Travailler à vos côtés et m'éveiller un peu plus à votre belle spécialité furent un réel plaisir.

Soyez assurée de ma profonde estime et de ma grande reconnaissance.

A tous ceux qui ont contribués activement à ce travail

-A Valérie VELASCO, merci pour ton aide si précieuse, ta rigueur et ton organisation. Merci pour le temps que tu as consacré à ce travail.

-A Véronique BROUSTE, un grand merci pour ton aide pour toutes les statistiques, si bien détaillées, et ta grande disponibilité.

A mes maîtres d'Oncologie

Monsieur le Professeur BONNEFOI, pour l'incroyable qualité de votre enseignement et la rigueur que vous avez su nous transmettre. Soyez assuré de mon profond respect.

Un grand merci à toutes les équipes d'oncologie de Bergonié qui participent activement à notre formation et plus particulièrement aux Docteur DEBLED, Docteur FONCK, Docteur FLOQUET, ainsi qu'à Nathalie et Mikaël.

Merci à l'équipe d'oncologie du CHU pour leurs enseignements, leur disponibilité et la transmission des valeurs humaines si importantes dans notre métier. Merci à Laurence, Denis, Marine et Nathalie.

Un grand merci au service d'anatomo-pathologie de Bergonié pour leur accueil si chaleureux et leur gentillesse.

Au Docteur Dominique ROUX et à toute son équipe du Bouscat, pour le travail formidable qu'ils font. Vous m'avez accueilli avec bienveillance dans votre service et j'ai pu bénéficier de votre savoir, de votre disponibilité et apprécier vos grandes qualités de clinicien. Soyez assuré de ma profonde estime.

A mes anciens chefs de Clinique

Anne CADIER, Sophie ROCA, Delphine GARBAY, Guilhem ROUBAUD et Marie DESJARDINS. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis.

A mes co internes (presque tous déjà docteurs !) :

-A Camille, ma confidente, merci pour cette belle amitié !

-A Louis, et merci pour ces 6 mois passés ensemble, pour les fous rires et la déconnade !

-A Florie, pour ton grain de folie et ces bons moments passés ensemble

-A Charlotte, toute première personne rencontrée à Bordeaux ! Aux 6 mois passés en radiothérapie ensemble

-A Thomas, jeune papa épanoui!

-A Amaury, pour tous ces bons moments passés ensembles à nos soirées entre internes, les ASIO etc… Merci pour ta grande implication dans notre formation !

-A Diégo, qui suit mes traces… ? Mais quel bon choix ! Deux oncologues dans la famille !

-A tous les autres !

A ma Famille

-A mon mari, Arnaud. Pour ta présence et ton immense soutien depuis toutes ces années et plus particulièrement pour ce travail. Merci pour le bonheur d'être avec toi chaque jour. Merci pour ton amour, pour tout ce qu'on a construit ensemble et tout ce qui reste à venir.

-A Thaïs, grâce à qui je m'émerveille chaque jour depuis presque 3 ans. Pour tout l'amour que tu nous donnes, sans compter, et pour cette joie de vivre permanente!

-A notre petit Jules, qui fait la fierté de son papa (et la mienne aussi bien sûr !). Pour ce petit bout de gaité, de douceur. Si petit, mais déjà plein d'amour et de tendresse.

-A mes parents, pour votre amour inconditionnel, votre dévouement permanent et les belles valeurs que vous m'avez transmises. Pour l'exemple que vous représentez pour moi. Un grand merci pour votre immense soutien depuis tant d'années sans lequel je n'aurais pu en arriver là. Avec tout mon amour.

-A mes 2 sœurs, pour ce lien si fort qui nous unit, votre présence indispensable à mes côtés, et votre amour, malgré nos différences. Hortense la rebelle, Mercédès la rêveuse ! Et à Alexandre qui vient de rejoindre la famille pour notre plus grand bonheur.

-A Mamita, pour toute ta tendresse, ton amour et ton aide si précieuse. A notre bon papa Georges, tant regretté.

-A Bon-papa Hubert, pour ton amour et ta droiture. Merci pour tous les souvenirs de ta jeunesse que tu nous as transmis et merci pour les heures passées à nos devoirs de latin, d'allemand, de math etc… A Mutti, qui aurait été si fière (j'entends encore son rire !) et qui nous manque tant.

-A mes beaux-parents, pour votre accueil si chaleureux au sein de votre belle famille et votre présence à nos côtés. A mes beaux-frères et belle-sœur, pour votre spontanéité et votre joie de vivre.

-A mes 2 cousines chéries, (presque sœurs !) Camille et Mathilde, à leurs supers maris et à leurs adorables enfants. Spécial dédicace pour ma filleule Pénélope.

-A mes Oncles et Tantes, cousins et cousines, merci pour toutes les grandes réunions de famille, et tous ces beaux souvenirs de vacances partagées ensembles.

A mes amis :

-A Charlotte, Marie et Pierre, mes amis depuis toujours. Merci pour votre fidélité depuis le bac à sable !

-Aux « gars de Bichat », aux vrais de vrais… Parce qu'on dit qu'une amitié qui dure plus de 7 ans est une amitié pour la vie… :

A Raf, Charlotte et leur petite Valentine, pour votre amitié sans faille, pour votre présence à nos côtés depuis tant d'années, et pour toutes les années à venir… Un grand merci

A Djof, pour ta présence à nos côtés depuis si longtemps, ces moments inoubliables partagés ensembles depuis la P1, les années fac et tout le reste… Merci pour cette belle amitié!

A Bibi, parti trop loin… Au « Bibi pieds dans l'eau », au bibi rencontré à SuperDé, c'était « Nickel »… ! Tu nous manques et on attend ton retour avec impatience.

A la famille Souchon, les kilomètres ne nous ont pas éloignés, heureusement, c'est toujours un plaisir d'être avec vous. Merci pour votre amitié et votre grande fidélité !

A Emeric et Nathou, merci pour votre présence, votre amitié, vos valeurs. On vous souhaite pleins de très belles choses à venir !

A Johanns, Violaine et Marius. On est tellement content de vous avoir à Bordeaux à nos côtés !

Aux Deneff, qu'on a hâte d'accueillir (un jour viendra…). On est fier de vous compter parmi nos amis proches.

A tous les autres : Roul, Duboc, Marica…

-Aux Bordelais :

Mention spéciale à Amandine, pour ton immense générosité, ta présence à nos coté depuis « Mont De », ton amitié et ta profonde tendresse envers nos petits bouts, qui te le rendent bien d'ailleurs… et merci d'avoir pris le temps de relire ma thèse !

Aux orthopédistes : à Verdier, Masquefa et leurs formidables femmes (et au petit Clément) ! Une très belle rencontre ! En espérant que ce ne soit que le début d'une longue amitié … ! Aux Demezon, pour les bonnes soirées passées ensembles ! Finalement l'orthopédie ça a du bon !

TABLES DES MATIERES

Partie 1 : CANCERS COLORECTAUX 10

1. EPIDEMIOLOGIE 10

1.1 Incidence 10

1.2 Mortalité 10

2. CARCINOGENESE 11

2.1 Instabilité chromosomique 11

2.2 Instabilité des microsatellites 12

2.3 Hyper méthylation de l'ADN (phénotype CIMP) 13

3. FACTEURS PRONOSTIQUES 13

Partie 2 : IMMUNITE ET CANCER 17

1. GENERALITES 17

1.1 Immunité innée 17

1.2 Immunité adaptative 18

1.2.1 Les lymphocytes T 19

1.2.2 Les Lymphocytes B 20

2. VOIES DE CO-STIMULATION 20

2.1 Les molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines 22

2.2 La voie CD40 / CD40L 24

2.3 Les voies de co-stimulation appartenant à la famille des récepteurs des cytokines 25

3. IMMUNITE ET CARCINOGENESE 26

3.1 Immunosurveillance 26

3.2 Immunoediting 27

Partie 3: PROGRAMMED DEATH ONE (PD-1) 28

1. IDENTIFICATION DE PD-1 28

2. STRUCTURE ET EXPRESSION 28

3. LES LIGANDS DE PD-1 29

4. VOIE DE SIGNALISATION 31

5. ROLE PHYSIOLOGIQUE DE PD-1 DANS LE MAINTIEN DE LA TOLERANCE IMMUNE 33

6. PD-1 ET CARCINOGENESE 34

7. ROLE PRONOSTIQUE DE PD-L1 34

8. IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES 34

9. FACTEURS PREDICTIFS DE REPONSE AU TRAITEMENT 35

Partie 4: ETUDE RETROSPECTIVE 36

1. INTRODUCTION/OBJECTIFS DE L'ETUDE 36

1.1 Objectif principal 36

1.2 Objectifs secondaires 36

2. MATERIELS ET METHODES 37

2.1 Population 37

2.1.1 Critères d'inclusion 37

2.1.2 Critères d'exclusion 37

2.2 Critères de jugement 37

2.2.1 Critère de jugement principal 40

2.2.2 Critères de jugement secondaires 42

2.3 Analyses statistiques *42*
2.3.1 Analyse de survie 43
2.3.2 Analyse pronostique 43
2.3.3 Analyse de la reproductibilité du TMA 43
2.3.4 Tests de corrélations des marqueurs avec l'expression de PD-L1 43
3. RESULTATS 44
3.1 Analyses descriptives *44*
3.1.1 Caractéristiques de la population étudiée 44
3.1.2 Caractéristiques de la prise en charge 46
3.1.3 Expression des marqueurs 46
3.2 Analyse de survie *49*
3.3 Analyses pronostiques *51*
3.4 Analyses de corrélations *54*
4. DISCUSSION 56
5. CONCLUSION 60

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BCR : B-Cell Receptor

CCR : Cancers colorectaux

CCRm: Cancers Colorectaux métastatiques

CIMP : CpG Island Methylation Phenotype

CIN : Chromosomal Instability

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CT : Chimiothérapie

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4

HES : Hématéine Eosine Safran

HR : Hazard ratio

IHC : Immunihistochimie

INF : Interferon

IL : Interleukine

LT : Lymphocyte T

LT4 : Lymphocyte T CD4+

LT8 : Lymphocyte T CD8+

LTreg : Lymphocyte T régulateur

MSI : Microsatellite Instability

MSS : Microsatellite Stable

NK: Natural Killer

PD-1: Programmed cell Death 1

PD-L1: Programmed cell Death Ligand 1

PD-L2: Programmed cell Death Ligand 2

TAM: Tumor Associated Macrophage

TIL: Tumor infiltrative Lymphocyte

TGF-β: Tumor Growth Factor Beta

TCR: T-Cell Receptor

TMA : Tissue Micro Array

Partie 1 : CANCERS COLORECTAUX

1. Epidémiologie

1.1 Incidence

La France fait partie des pays ayant une incidence élevée de cancer colorectal (CCR) avec environ 40 500 nouveaux cas par an en 2011. Il se situe au 3ème rang de l'ensemble des cancers, tous sexes confondus, après le cancer de la prostate (71 000 nouveaux cas/an) et le cancer du sein (53 000 nouveaux cas/an).

L'incidence du CCR augmente avec l'âge : faible avant 30 ans, elle augmente de manière importante à partir de 50 ans, puis double tous les dix ans avec une incidence maximale à 70 ans. L'âge moyen au diagnostic en 2012 était de 70 ans chez l'homme et de 73 ans chez la femme.

Les taux d'incidence du CCR entre 1980 et 2012 augmentent progressivement, il est passé de 34,7 à 38,4 cas pour 100 000 chez l'homme et de 23,0 à 23,7 pour 100 000 chez la femme. Cependant les tendances récentes montrent un ralentissement de l'évolution de ces taux d'incidence depuis une dizaine d'années aussi bien chez l'homme que chez la femme (1).

1.2 Mortalité

Avec environ 17 500 décès en 2011 (dont 53% chez l'homme), le CCR se situe, tous sexes confondus, au deuxième rang des décès par cancer derrière le cancer du poumon (29 100 décès) et devant le cancer du sein (11 500 décès). Il représente ainsi 12% de l'ensemble des décès par cancer.

Il existe depuis quelques années une baisse du taux de mortalité. Cette baisse de la mortalité résulte des progrès réalisés dans le dépistage de la maladie grâce à un diagnostic plus précoce, dans l'amélioration de la prise en charge thérapeutique et dans la diminution de la mortalité péri-opératoire (2–4).

2. Carcinogénèse

Le type histologique largement majoritaire des cancers colorectaux est l'adénocarcinome. Il peut survenir en muqueuse saine dans environ 20% des cas, ou bien se développer à partir d'un adénome (polype adénomateux) préexistant dans 80% des cas.

La survenue d'un cancer est le résultat de l'accumulation d'altérations génétiques aboutissant à la prolifération incontrôlée des cellules néoplasiques grâce à des caractéristiques phénotypiques telles que l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance et d'apoptose, le potentiel de réplication sans limites, l'activation de l'angiogenèse, la capacité à envahir les tissus adjacents et à distance, la capacité de résistance à la destruction par le système immun et l' induction d'une inflammation chronique stimulant la prolifération (5,6).

On estime que plus de 80% des cancers colorectaux sont sporadiques. Mais il existe également des formes familiales, moins fréquentes, telles que le syndrome de Lynch ou encore la polypose adénomateuse familiale.

Au cours des dernières années, de nombreuses études sur les voies de carcinogénèse du CCR ont permis une avancée considérable des connaissances. Les principaux objectifs sont d'identifier des altérations moléculaires pronostiques et/ou prédictives d'une réponse au traitement pour optimiser la prise en charge des patients. Actuellement, trois phénotypes distincts ont été décrits : l'instabilité chromosomique (CIN, chromosomal instability), l'instabilité des microsatellites (MSI) et l'hyperméthylation des ilots CpG (CIMP) (7) .

2.1 Instabilité chromosomique

Le phénotype CIN est le plus fréquent parmi les CCR, puisqu'il représente 80 % des CCR sporadiques (8). Il est caractérisé par la survenue de pertes alléliques. Les segments les plus fréquemment touchés sont le bras court des chromosomes 17, 8 et le bras long des chromosomes 18, 5 et 22 (9). La perte d'un gène est appelée la perte d'hétérozygotie (LOH, loss of heterozygosity).

Ces pertes alléliques sont fréquemment associées à des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs, tels que *TP53* et *APC* (10).

Ces instabilités chromosomiques apparaissent précocement dans la carcinogénèse puisqu'on les retrouve dans la majorité des adénomes (11,12).

2.2 Instabilité des microsatellites

L'autre groupe des CCR est caractérisé par un défaut de réparation des mésappariements de l'ADN (*DNA mismatch repair* ou *MMR, ou système RER (réparation des erreurs de réplication)*) qui se traduit par la présence d'une instabilité des locus microsatellites. Cette instabilité micro-satellitaire représente environ 15% des cancers colorectaux sporadiques et est également retrouvée dans 100% des formes héréditaires du syndrome de Lynch (5% des CCR) (8).

Ce défaut de réparation est lié principalement à l'hyperméthylation de la région promotrice du gène *hMLH1* dans les cancers sporadiques. Dans le cas du syndrome de Lynch, cette altération du système MMR est liée à des mutations inactivatrices des gènes *hMSH2, hMLH1, hMSH6 et PMS2*. Plus rarement le syndrome de Lynch peut être lié à une mutation du gène *TACSTD1* (13) responsable de l'inactivation de MSH2 (14) ou hypermethylation du promoteur de *hMLH1* (15). Les tumeurs appartenant à ce groupe ont un phénotype appelé MSI.

Ce déficit du système de réparation MMR entraîne une accumulation de mutations secondaires notamment au niveau de ces séquences répétées, dont les conséquences peuvent être délétères si ces dernières se situent au niveau de régions codantes de l'ADN. En conséquence, de nombreux gènes impliqués dans des voies de contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN peuvent être inactivés (16).

2.3 Hyper méthylation de l'ADN (phénotype CIMP)

Plus récemment, des anomalies de la méthylation de l'ADN ont été mises en évidence dans les tumeurs colorectales. Il s'agit de modifications épigénétiques c'est-à-dire un ensemble de phénomènes influençant l'expression d'un gène sans pour autant modifier sa séquence d'ADN.

Ces anomalies de la méthylation touchent les cytosines des îlots CpG qui sont des dinucléotides CG localisés au niveau des promoteurs et des premiers exons des gènes et entraînent leur inactivation transcriptionnelle, donnant ainsi l'acronyme de ce phénotype CIMP (*CpG Island methylation phenotype*) (17). Environ 30% des CCR présentent un phénotype CIMP.

Ces cancers présentent un profil d'altérations génétiques particulier. On les retrouve fréquemment associés à un phénotype MSI lié à l'hypermethylation de *hMLH1*, et à une mutation de l'oncogène BRAF mais à une fréquence des mutations TP53 plus faible que dans les CCR de phénotype CIN (18,19).

3. Facteurs pronostiques

En oncologie clinique, la connaissance des facteurs pronostiques est un outil important à la décision thérapeutique. En effet ils permettent, entre autre, d'ajuster les traitements adjuvants en fonction du pronostic attendu. Un certain nombre de facteurs pronostiques ont clairement été établis dans les CCR depuis de nombreuses années. Ils sont principalement histo-pronostiques, et il existe peu de facteurs biologiques connus à ce jour.

A l'heure actuelle, le stade TNM reste le facteur pronostique essentiel dans la prise en charge des CCR (tableau 1) (20).

Il s'agit d'une classification histo-pronostique qui repose, après échantillonnage précis, sur l'envahissement en profondeur de la tumeur (pT) et son extension dans les ganglions lymphatiques locaux (pN) et à distance (pM) lorsqu'une métastase est histologiquement

documentée. La survie après le diagnostic d'un cancer colorectal est fortement influencée par le stade histo-pronostique.

Tableau 1. Classification TNM (UICC, AJCC 2010. 7ème édition)

T	T1 Envahissement du chorion ou de la sous-muqueuse ou taille < 2 cm T1a : < 1 cm T1b : 1 à 2 cm T2 Envahissement de la musculeuse ou taille > 2 cm T3 Envahissement de la sous-séreuse ou des tissus périrectaux T4 Atteinte de la séreuse ou des structures adjacentes T4a : perforation du péritoine viscéral T4b : adhésion ou invasion d'un organe de voisinage
N	Nx : ganglions non évalués N0 : pas de métastase ganglionnaire N1 : 1 à 3 ganglions métastatiques régionaux N1a : 1 ganglion métastatique N1b : 2 ou 3 ganglions métastatiques N2 : 4 ganglions métastatiques régionaux ou plus N2a : 4 à 6 ganglions métastatiques N2b : 7 ganglions ou plus
M	M0 : pas de métastase M1 : métastases à distance (dont ganglions sus-claviculaires)

D’autres facteurs ont également un rôle pronostique connu, il s’agit du taux d’ACE préopératoire (21), du grade histologique, de la qualité de l’exérèse chirurgicale, du statut des marges de résection dans les tumeurs rectales. L’envahissement vasculaire ou péri-nerveux est également prédictif de survie.

Au-delà de ces marqueurs qui sont reconnus pour avoir une valeur pronostique indépendante, d'autres marqueurs ont été récemment mis en exergue.

En effet, parmi les paramètres moléculaires, il est aujourd'hui connu que les patients présentant une tumeur de phénotype MSI, par exemple, constituent un groupe particulier dont le pronostic et la réponse à la chimiothérapie paraissent différents (22,23).

Le rôle pronostique du statut RAS reste controversé dans les CCR métastatiques (24,25) mais semble plus évident dans les stades localisés (26). En revanche sa valeur prédictive de réponse aux traitements anti-EGFR est clairement établie depuis plusieurs années, avec un impact important sur la prise en charge des patients métastatiques puisque l’utilisation des anti-EGFR est guidée par le statut RAS (27,28).

Il est également connu que la mutation de BRAF (V600E), qui survient dans 5 à 10% des CCR métastatiques, est associée à un phénotype plus agressif, une résistance à la chimiothérapie et une survie globale inférieure (29,30).

Au total, la détermination du statut moléculaire de la tumeur devient une étape importante dans la prise en charge personnalisée des malades.

En dehors de ces facteurs propres à la tumeur, des facteurs liés à l’hôte, telle que la réponse immune, apparaissent également très prometteurs (31,32). En effet, la tumeur primitive et ses métastases se développent au sein d’un microenvironnement comportant des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire. Ainsi, certains travaux suggèrent que des médiateurs de l’inflammation pourraient favoriser le développement tumoral et métastatique en induisant des mutations tumorales et des résistances à l’apoptose (33,34). Et inversement, le système immunitaire pourrait empêcher le développement tumoral par les mécanismes dits d’immunosurveillance (35). Plus récemment deux études du groupe de F. Pagès et al. (31,32) ont cherché à mieux caractériser la réponse immunitaire anti tumorale en étudiant sa nature, son orientation

fonctionnelle, sa densité et la localisation des populations de cellules immunitaires au sein de régions tumorales distinctes. Les auteurs ont ensuite corrélé les variables obtenues avec l'évolution tumorale et la survie des patients. Ils ont ainsi pu mettre en évidence l'importance de l'immunité adaptative dans la prévention de la récidive tumorale, et même une corrélation entre l'infiltrat lymphocytaire CD8 et un meilleur pronostic (31,32).

C'est dans cette perspective que se sont développées les immunothérapies en oncologie, dans le but de concevoir des traitements anti-cancéreux capables d'exploiter la puissance potentielle d'une réaction immunitaire dirigée contre la tumeur.

Partie 2 : IMMUNITE ET CANCER

1. Généralités

Avant d'aborder la relation étroite qu'il existe entre l'immunologie et la carcinogénèse, il semble important de faire quelques rappels de base sur la réaction immunitaire.

Tout d'abord il faut distinguer l'immunité innée qui correspond à la réponse immunitaire immédiate, de l'immunité acquise qui est spécifique, liée aux antigènes (Ag) et se fait par la sélection de clones lymphocytaires de manière plus tardive mais plus durable.

On distingue également l'immunité humorale de l'immunité cellulaire. La principale différence réside dans la différence d'effecteurs par lesquels elles interviennent. Dans l'immunité cellulaire, les cellules médiatrices sont principalement les lymphocytes T, alors que dans l'immunité humorale il s'agit d'agents solubles tels que les anticorps ou le complément. Toutefois, on ne peut pas parler de ces deux types de réactions de manière totalement indépendante. En effet les cellules participent à l'initiation des réponses par les anticorps (Ac), ceux-ci étant le maillon essentiel dans certaines réactions à médiation cellulaire.

1.1 Immunité innée

La réponse immunitaire humorale innée fait appel à des molécules préexistantes à la menace et se fait par le biais des anticorps naturels et du complément.

La réponse immunitaire cellulaire innée, ou phénomène à médiation cellulaire, est également indépendant des Ag. Elle fait appel à différentes cellules que sont les lymphocytes naturel killer (NK) et les cellules phagocytaires, parmi lesquelles on compte les polynucléaires, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules vont ainsi devenir des cellules présentatrices d'antigène (CPA), parmi lesquelles les cellules dendritiques jouent un rôle majeur.

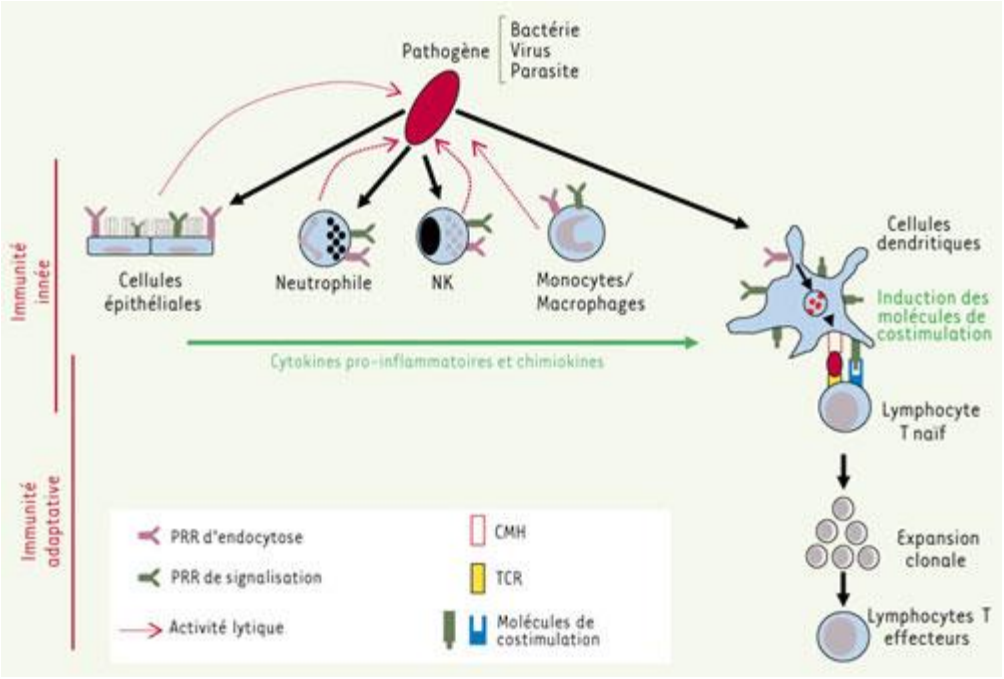


Figure 1. Rôle central des cellules dendritiques, lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative

Suite à l'entrée d'un pathogène, les cellules dendritiques ainsi que les autres cellules de l'immunité innée (cellules épithéliales, neutrophiles, NK = Natural Killer, monocytes /macrophages) sont activées par leurs récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) qui reconnaissent des motifs du pathogène et produisent alors diverses molécules (des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines).

Les cellules dendritiques activées subissent alors un processus de maturation et deviennent des cellules présentatrices d'antigène capables d'activer des lymphocytes naïfs et donc d'induire ainsi la réponse adaptative.

1.2 Immunité adaptative

L'immunité adaptative (ou acquise) est une réaction spécifique à un antigène particulier.

Elle possède quatre propriétés fondamentales : une spécificité antigénique, la capacité de reconnaissance d'une grande diversité d'antigènes, une capacité de mémoire ainsi qu'une capacité de discrimination du *soi* et du *non-soi.*

Elle met en jeu les lymphocytes.

1.2.1 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) sont responsables de *l'immunité cellulaire adaptative*, qui vise à détruire les cellules pathogènes, que ce soit des bactéries ou des cellules cancéreuses. La réponse immunitaire cellulaire commence par l'activation des LT naïfs, qui engendre la prolifération de ces derniers ainsi que leur différenciation en cellules effectrices.

Caractéristiques structurales :

Ils possèdent un récepteur membranaire, le TCR (récepteur de cellules T) qui a pour propriété de reconnaitre des fragments peptidiques antigéniques associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et cela de manière spécifique. Il est associé aux clusters de différenciation (CD) qui sont des molécules ayant des fonctions différentes les unes des autres. Les LT présentent le TCR associé au complexe CD3, et également à un des deux clusters de différentiation CD4 ou CD8. On distingue plusieurs types de LT:

- **Les lymphocytes T-CD4+** (LT4) qui reconnaissent les Ag portés par les molécules du CMH de classe II. Leur action principale est la production de cytokines qui vont amplifier la réaction immunitaire en activant et recrutant d'autres lymphocytes. Les LT4 naïfs vont se différencier en LT helpers (Th). Il existe plusieurs types de lymphocytes Th, les Th-1 qui activent les macrophages pour détruire le matériel phagocyté (immunité cellulaire) et les Th-2 qui aident les cellules B à produire des anticorps (immunité humorale), les Th-17 (pro-inflammatoires) et les LT régulateurs qui ont une action immunosuppressive sur les LT effecteurs et les CPA.

Les cytokines produites par les LT sont des médiateurs solubles de la communication entre les cellules de l'organisme. Les interleukines (IL) sont les cytokines qui servent à la communication entre cellules immunitaires. Il existe de multiples cytokines. Bien qu'elles soient sécrétées en réponse à une stimulation antigénique spécifique, elles n'ont intrinsèquement aucune spécificité antigénique.

- **Les lymphocytes T-CD8+** (LT8) reconnaissent les Ag présentés par le CMH de classe I. Ils vont s'activer en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ils sont capables de détruire directement les cellules cibles.

Une partie des lymphocytes effecteurs se transformera en **lymphocytes T mémoires**. Ils sont capables de réagir plus rapidement, plus efficacement, et plus vigoureusement que les lymphocytes T naïfs lors d'une rencontre ultérieure avec le même pathogène. C'est la réponse secondaire.

1.2.2 Les Lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont responsables de *l'immunité humorale adaptative*. Ils reconnaissent l'Ag via les Immunoglobulines (Ig), également appelées anticorps. Il y a alors une prolifération clonale et une différenciation des LB en plasmocytes. Une partie se différenciera en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps ayant une longue durée de vie, et l'autre partie se transformera en LB mémoires. Les Ig sont regroupées en différentes classes (A, D, E, G, M).

Les Ac vont se liés aux Ag et former ainsi le complexe immun, qui va activer les molécules du complément qui vont ensuite détruire ce complexe immun.

2. Voies de Co-stimulation

Le système immunitaire est constamment confronté aux difficultés d'assurer la défense contre les différents pathogènes rencontrés, sans débordement ni rupture de la tolérance immune. Ces fonctions nécessitent une régulation fine et sophistiquée ainsi que la présence de plusieurs étapes de contrôle. La tolérance immune d'origine centrale (thymique pour les LT et au niveau de la moelle osseuse pour les LB) constitue une première étape de sélection permettant d'éliminer la majorité des lymphocytes auto-réactifs. Cependant, certains clones auto-réactifs réussissent à passer ce premier filtre et se retrouvent en périphérie (36,37) exposant au risque de développement de réactions auto-immunes. Il existe donc des

stratégies au niveau périphérique permettant d'assurer le maintien de l'homéostasie immunitaire. Par exemple l'activation des LT naïfs suite à l'engagement du TCR par le complexe CMH-Ag est soumise à une régulation complexe faisant intervenir plusieurs corécepteurs. Il s'agit des points de contrôle (check points) immunitaires. Ceux-ci délivrent un second signal d'activation qui est indépendant de l'Ag, mais qui est nécessaire pour compléter l'activation des LT. Sans ce second signal, l'activation cellulaire T est incomplète (38). Ces molécules de la co-stimulation interviennent d'autre part lors de la phase d'amplification de la réponse immune, lors du contact entre le LT et le LB.

Les voies de co-stimulation fonctionnent par contact cellulaire direct, par l'intermédiaire de molécules exprimées à la surface des cellules, et de cette interaction naît le second signal d'activation. Ces molécules forment un couple ligand-récepteur, exprimé par le lymphocyte et la CPA.

Le signal délivré par ces voies de co-stimulation peut être de deux types :

• il peut correspondre à un **signal activateur**, contribuant ainsi à l'activation cellulaire complète. Il s'agit des molécules CD28, ICOS et CD40.

• ou inversement, il peut correspondre à un **signal de type inhibiteur**. Il s'agit de molécules telles que CTLA-4 ou PD-1.

Elles sont également regroupées par famille selon leur homologie vis-à-vis de certaines grandes familles moléculaires. Ainsi, les molécules des voies de co-stimulation sont regroupées en 3 familles principales (39–41) :

• les molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines

• celles appartenant à la famille des récepteurs du TNF α

• et une troisième famille des récepteurs aux cytokines (39–41)

2.1 Les molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines

Il s'agit des molécules de la famille B7. Cette famille comprend les voies CD28/ B7-1 (ou CD80), B7-2 (ou CD86), CTLA-4 / B7-1, B7-2, PD-1 / PD-L1, PD-L2, ICOS / ICOSL, B7H3, B7H4 et BTLA. La voie de co-stimulation la mieux connue et dont le rôle dans l'activation lymphocytaire est bien établi est la voie CD28 / B7-1, B7-2.

- La voie CD28/ B7-1, B7-2

CD28 est exprimé par le LT. Son interaction avec les molécules B7-1 (ou CD80) et B7-2 (ou CD86) après le premier signal d'activation sera responsable de la délivrance du second signal qui est un signal positif, à l'origine de la réponse immunologique complète et soutenue, avec accumulation intracellulaire de facteurs de transcription (AP-1, Nuclear Factor of Activated T cells ou NFAT), production d'interleukine -2 (IL-2) et d'autres cytokines (IFN), division cellulaire et prolifération lymphocytaire (42,43).

- La voie CTLA-4/ B7-1, B7-2

CTLA-4 est exprimée également sur le LT activé et interagit avec les mêmes ligands que CD28, mais avec une affinité plus importante. Cette interaction CTLA-4 / B7-1, B7-2 est à l'origine d'un signal inhibiteur de l'activation cellulaire. L'interaction de CTLA-4 avec ses ligands est responsable d'une inhibition de la transcription de l'IL-2 en inhibant la translocation de NFAT dans le noyau cellulaire.

- La voie PD-1/ PD-L-1, PD-L2

Cette voie sera détaillée de manière plus complète par la suite.

La molécule PD-1 est exprimée sur les lymphocytes après l'activation cellulaire T et B. L'interaction entre PD-1 et ses ligands PD-L1 ou PD-L2 est à l'origine d'un signal inhibiteur de l'activation médiée par le TCR, de la production de cytokines (IL 2), et touche aussi bien les cellules T que B.

- La voie ICOS / ICOSL

ICOS (Inducible COStimulatory receptor) est une molécule induite à la surface des cellules T lors de l'activation lymphocytaire. Le ligand d'ICOS (ICOSL ou B7h) est exprimé de façon constitutive sur les cellules B, les macrophages, mais aussi lors de la réaction inflammatoire sur des tissus n'appartenant pas au système lymphoïde : cellules endothéliales, fibroblastes, cellules épithéliales. La stimulation par l'intermédiaire de CD28 ou d'ICOS présente certaines similitudes, et sont considérées comme agissant en synergie. La voie ICOS joue un rôle important dans la production d'IL-10 et un rôle régulateur en auto-immunité et dans l'allergie.

- Les voies B7H3, B7H4, BTLA

B7H3 est exprimée après activation par les cytokines inflammatoires sur les cellules dendritiques et les monocytes. L'interaction avec son ligand serait à l'origine d'une activation cellulaire. La mise en jeu de B7H4 est à l'origine d'un signal inhibiteur sur les LT et LB. B7H4 est exprimée par certaines cellules tumorales suggérant son implication dans l'immunité anti-tumorale. BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator) est considéré pour l'instant comme le récepteur de B7H4. BTLA est exprimé par les cellules T de phénotype Th1 et non Th2.

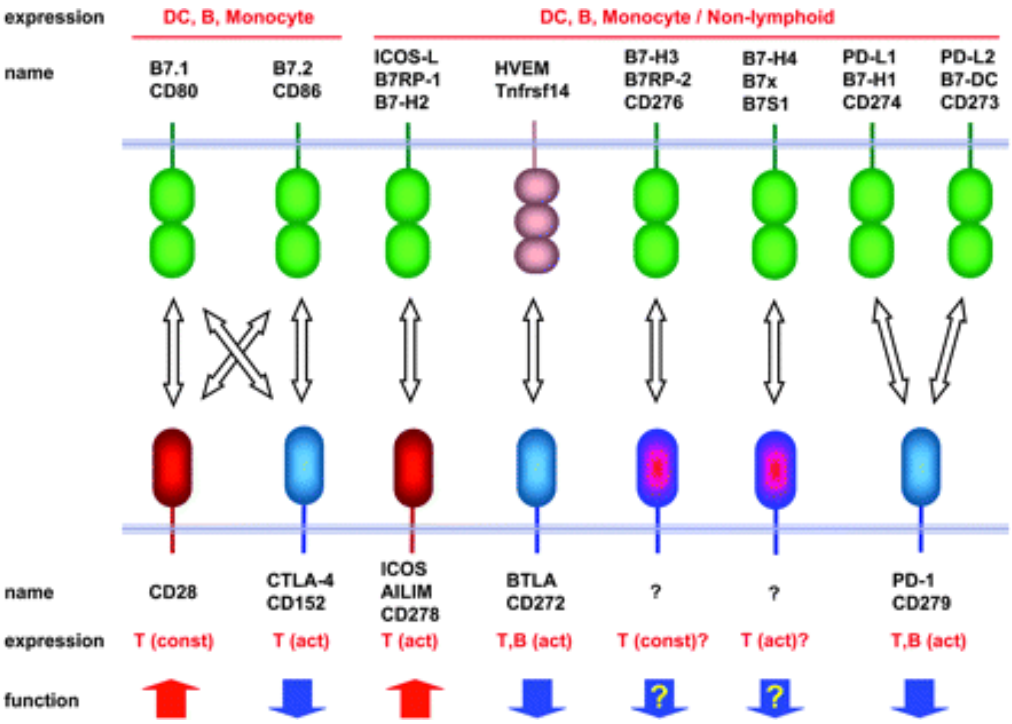


Figure 2. Les molécules de la famille des CD28 : membres et ligands. Les noms, le profil d'expression et la fonction sont indiqués. Act, expression suite à une activation; const, expression constitutive (44).

2.2 La voie CD40 / CD40L

CD40 est exprimé de façon constitutive sur les LB, les macrophages et les cellules dendritiques.

CD40 ligand (CD40L ou CD154) est un membre de la famille du TNF. Cette glycoprotéine membranaire est principalement exprimée sur les LT4 et ce rapidement après l'activation via le TCR. Son expression est régulée par la liaison du TCR à l'Ag et par d'autres molécules de co-stimulation, notamment CD28 et ICOS.

L'interaction de CD40L avec CD40 est à l'origine d'un signal d'activation.

2.3 Les voies de co-stimulation appartenant à la famille des récepteurs des cytokines

Il s'agit principalement d'OX40, 4-1BB, et CD27.

- OX40

OX40 (ou CD134) est exprimée principalement sur les LT4, et à un moindre degré sur les LT8, les LB et les cellules dendritiques. Cette molécule est induite lors de l'activation cellulaire via le TCR. Les LT activés et présents aux sites inflammatoires expriment OX40. Le ligand d'OX40 ou OX40L est observé à la surface des CPA, cellules dendritiques, les lymphocytes B et macrophages. OX40L est également exprimé par les cellules endothéliales, favorisant ainsi la migration des LT aux sites inflammatoires.

- 4-1BB

4-1BB (ou CD137) est exprimé par les LT4 et LT8 activés, mais aussi par les LB, macrophages, cellules dendritiques et cellules NK. Son ligand ou 4-1BBL est retrouvé à la surface des CPA, après activation cellulaire.

- CD27

À l'inverse des deux molécules précédentes, il est exprimé par les LT non activés. Son ligand, CD27L (ou CD70) est inductible sur les CPA.

Ces différentes molécules présentent de nombreuses similitudes, notamment les types cellulaires sur lesquels elles sont exprimées. Elles sont responsables d'un signal de type activateur, que ce soit isolément ou en association avec CD28. Toutefois, elles ne sont pas mises en jeu simultanément et, probablement successivement, assurant ainsi des fonctions différentes dans la phase d'expansion ou de maintenance de la réponse cellulaire après la reconnaissance antigénique par le TCR et l'activation de la voie CD28. Ainsi, ces différentes molécules coopèrent de façon séquentielle.

3. Immunité et Carcinogénèse

3.1 Immunosurveillance

Il existe au sein du microenvironnement tumoral un infiltrat immunitaire plus ou moins abondant selon les tumeurs. Cet infiltrat est composé de différentes cellules de l'immunité innée et acquise. Il comprend notamment :

- Les TILs, les lymphocytes infiltrant les tumeurs (Tumor-Infiltrative Lymphocytes) qui correspondent aux cellules NK et NKT, LT8 mémoires et cytotoxiques et les LT4 mémoires et effecteurs (Th1, Th 2 et LT reg).

- Les TAM, macrophages associés aux tumeurs (Tumor-associated Macrophages), que l'on peut classer en 2 types : M1 ou M2.

- Les cellules dendritiques

- Les MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells)

C'est donc ce microenvironnement qui est impliqué dans l'immunité anti-tumorale. Ce concept est appelé immunosurveillance. Il existe une réponse innée via les macrophages et les cellules NK et une réponse adaptative qui fait appel aux CPA.

Comme toute réponse immunitaire, la réponse anti-tumorale adaptative doit être déclenchée par des cellules présentatrices d'antigène. Les cellules tumorales sont des cellules du soi et, de ce fait, bien qu'anormales, très faiblement inductrices de réponse du fait de leur faible antigénicité. Le rôle des CPA est alors crucial pour le développement d'une défense efficace. Il est bien établi que les cellules tumorales peuvent être reconnues spécifiquement par les cellules effectrices du système immunitaire. Il a été démontré que les cellules dendritiques étaient des CPA efficaces pour engendrer des effecteurs cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales (45).

3.2 Immunoediting

Malgré cette immunosurveillance opérée par le système immunitaire, certaines cellules tumorales peuvent se développer et constituer une tumeur. Le concept d'immunosurveillance a donc été repensé, laissant place à la théorie de l'immunoediting.

L'immunoediting est le concept qui décrit l'équilibre qui existe entre l'inflammation pro et anti tumorale (46). C'est la reconnaissance du concept du double jeu dans lequel est impliquée l'immunité dans la carcinogénèse. Ce principe repose sur 3 étapes (35) :

-Une première phase, qui est *la phase d'élimination*, qui correspond à l'immunosurveillance, comme décrite précédemment. C'est le mécanisme par lequel le système immunitaire est capable de reconnaitre et détruire les cellules tumorales.

-La deuxième phase correspond à *la phase d'équilibre*. On assiste alors à une maitrise de la prolifération des cellules tumorales sans qu'il n'y ait pour autant d'éradication, certaines de ces cellules ayant acquis des moyens de se soustraire au système immunitaire.

-Enfin, la troisième phase qui est *la phase d'échappement,* au cours de laquelle les cellules devenues résistantes déjouent le système immunitaire. Cette étape représente l'échec du système immunitaire à éliminer ou contrôler les cellules tumorales. Les principaux mécanismes sont la sécrétion de facteurs de croissance, la résistance aux facteurs antiprolifératifs tels que TGFβ, des stratégies d'échappement par l'expression de ligands inhibiteurs, (PD-L1, CTLA-4), une angiogenèse favorisée et le recrutement de cellules immunosuppressives (LT reg, TAM).

Partie 3: PROGRAMMED DEATH ONE (PD-1)

Parmi les récepteurs co-inhibiteurs, PD-1 a suscité depuis quelques années l'intérêt de nombreux travaux de recherche afin de caractériser sa structure, sa fonction, sa voie de signalisation ainsi que les pathologies qui peuvent lui être inhérentes ou associées (40).

1. Identification de PD-1

Cette molécule a été découverte initialement en 1992 par l'équipe du Professeur Tasuku Honjo en tant que molécule induite lors de la mort cellulaire programmée d'un hybridome T murin (47). La mise en évidence de l'homologue humain de PD-1 (*Pdcd1*) a été réalisée quelques années plus tard par la même équipe. Le gène humain de PD-1 est situé sur le chromosome 2 (48). Depuis, de nombreux travaux ont contribué à mieux caractériser cette molécule et à mieux comprendre ses fonctions.

2. Structure et expression

PD-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type I qui appartient à la superfamille des Immunoglobulines. Elle est composée d'un domaine IgV extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique qui contient deux motifs de signalisation de type « tyrosine-based signaling motifs » : un motif ITIM et un motif ITSM (48–50).

En raison de ses propriétés régulatrices et de la présence de similitudes structurales, la molécule PD-1 est assimilée à la famille des molécules de co-récepteurs CD28/CTLA-4 (51). Contrairement aux autres membres de cette même famille, PD-1 ne contient pas dans sa structure membranaire le résidu cystéine proximal nécessaire pour l'homo-dimérisation. Les analyses structurelles et biochimiques ont montré que PD-1 est une protéine monomérique aussi bien sous forme soluble que transmembranaire (52).

PD-1 peut être exprimé par les LB et LT, les cellules dendritiques et les cellules NKT.

En périphérie, les LT naïfs au repos n'expriment pas PD-1. C'est l'activation cellulaire par le TCR qui va induire de manière transitoire une expression importante de PD-1 (53–56).
Il en résulte une inhibition des LT qui est transitoire et spécifique.

Grâce à des modèles murins, il a été démontré que l'induction initiale de PD-1 suite à l'activation du TCR est également sous la dépendance du facteur de transcription notamment NFATc1 (57). Une étude plus récente montre que l'action synergique de NFATc1, STAT3 et STAT4 renforce et soutient l'expression de PD-1 sur les LT8 (58). Ainsi, par rapport aux LT8 activés par le TCR seul, l'action conjointe des cytokines IL-6 (STAT3) et IL-12 (STAT4) augmente l'expression de PD-1 (58).

Mais le caractère généralement transitoire de l'expression de PD-1 sur les LT suggère l'existence de facteurs qui l'inhibent. Certains travaux suggèrent que la voie de signalisation Notch serait également impliquée dans la régulation de l'expression de PD-1 par les LT8 activés (59).

De très nombreux travaux montrent que l'expression de PD-1 peut être anormalement prolongée et soutenue au cours de certains cancers et pathologies virales chroniques.

Les différents mécanismes de régulation de l'expression de PD-1 sont complexes et partiellement élucidés. La participation de plusieurs facteurs de transcription à la régulation de l'expression de PD-1 rend compte de sa grande capacité à répondre à de nombreux et différents stimuli, et le positionne comme ayant un rôle central dans la régulation immune.

3. Les ligands de PD-1

PD-1 interagit avec 2 ligands connus: Programmed Death Ligand 1 (PD-L1, B7-H1 ou CD274) et Programmed Death Ligand 2 (PD-L2, B7-DC ou CD273) (51,60).

PD-L1 est une protéine transmembranaire de type I codée par le gène *Cd274* situé sur le chromosome 9 (60).

La molécule PD-L2, second ligand de PD-1, présente une structure proche de celle de PD-L1 et son gène est également situé sur le chromosome 9 (61,62).

Malgré la présence d'homologies structurales et d'un récepteur commun, PD-L1 et PD-L2 présentent certaines différences qui concernent leurs profils d'expression cellulaire et leurs interactions avec PD-1.

En effet, PD-L1 présente une large distribution cellulaire et peut être exprimé constitutivement ou de manière inductible par un grand nombre de cellules hématopoïétiques, notamment les monocytes, les cellules dendritiques ainsi que les LT et LB activés et également des cellules non hématopoïétiques (60) (56,63) . De nombreux stimuli sont capables d'augmenter l'expression de PD-L1 sur les cellules hématopoïétiques. Par exemple, la stimulation des récepteurs à l'antigène (TCR ou BCR) renforce l'expression de PD-L1 sur les LT et LB. (63,64) L'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21 augmentent l'expression de PD-L1 sur les monocytes et, à l'exception de l'IL-21, sur les lymphocytes T. Par contre seule l'IL-21 induit une plus forte expression de PD-L1 sur les LB (65). L'interféron-β et l'interféron-γ sont tous les deux capables d'induire et d'augmenter l'expression de PD-L1 sur les monocytes et/ou les cellules dendritiques (66,67).

L'expression cellulaire de PD-L2 est beaucoup plus restreinte que celle de PD-L1. Son expression est inductible et principalement limitée à certaines cellules hématopoïétiques telles que les cellules dendritiques et les monocytes (56).

Par ailleurs, l'expression des ligands de PD-1 peut être induite sur les cellules tumorales au cours de certaines pathologies néoplasiques (développé plus loin).

Ces deux ligands ne sont pas spécifiques de PD-1 et n'interagissent pas exclusivement avec ce dernier. En effet, on connait depuis quelques années au moins un 2ème ligand pour PD-L1, il s'agit de la molécule B7-1, membre de la famille B7 et ligand de CD28 et CTLA-4 (68,69) (figure 1). Cependant, PD-L1 a une plus grande affinité pour PD-1 que pour B7-1 (69).

Les deux ligands de PD-1 affichent donc beaucoup de similitudes mais aussi plusieurs différences. Les fonctions de PD-1 se trouvent ainsi diversifiées et son champ d'action élargi.

Vu sa large expression tissulaire, PD-L1 est plutôt impliqué dans le contrôle des lymphocytes T auto-réactifs et le maintien de la tolérance immune vis-à-vis des auto-antigènes (70,71). Tandis que PD-L2, de par son expression restreinte aux CPA serait plus impliqué dans le contrôle des réponses immunes vis-à-vis des antigènes environnementaux. (50, 60, 71–76)

4. Voie de signalisation

En tant que membre de la famille CD28 et comme tous ses homologues, PD-1 agit en modulant la voie de signalisation des récepteurs à l'antigène (figure 2). PD-1 exerce ses fonctions grâce à la présence dans sa partie intra-cytoplasmique de deux résidus Tyrosine : le 1er est situé dans le motif ITIM proximal, et le second dans le motif switch ITSM distal (48–50).

Après stimulation du TCR, l'engagement concomitant de PD-1 avec l'un de ses ligands induit la phosphorylation de ses deux tyrosines permettant ainsi le recrutement de la phosphatase SHP-2 et probablement aussi de la phosphatase SHP-1 (55,61,78,79). Ces dernières vont à leur tour inhiber le co-récepteur CD28 et entraîner l'inactivation en aval de PI3K qui devient à son tour incapable d'activer Akt (79,80). De plus, PD-1 active la phosphatase PTEN qui à son tour réprime davantage la voie PI3K-Akt (81). En inactivant PI3K, PD-1 inhibe directement l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-xL et affecte la survie du LT (55) (figure 2). De plus cette inactivation réprime Akt, empêche la production de l'IL-2 qui est elle-même cruciale pour la survie et la prolifération des lymphocytes T (82) (figure 3).

En inactivant ainsi la voie de signalisation PI3K-Akt mais aussi la voie ERK, PD-1 est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T par arrêt en phase G0/G1. Cet effet est en partie restauré par l'apport d'IL-2 (83).

En résumé, l'activation de la voie de signalisation de PD-1 permet d'abroger les effets du TCR et de la molécule de co-stimulation CD28. De ce fait, ces évènements conduisent à une atténuation, voire une inhibition de l'activation, de la prolifération et de la différentiation cellulaire. Les fonctions effectrices ainsi que la survie des LT sont également perturbées (figure 3). Au total, L'axe PD-1/PD-1 Ligands peut ainsi conduire à l'anergie du LT voir même à sa suppression physique.

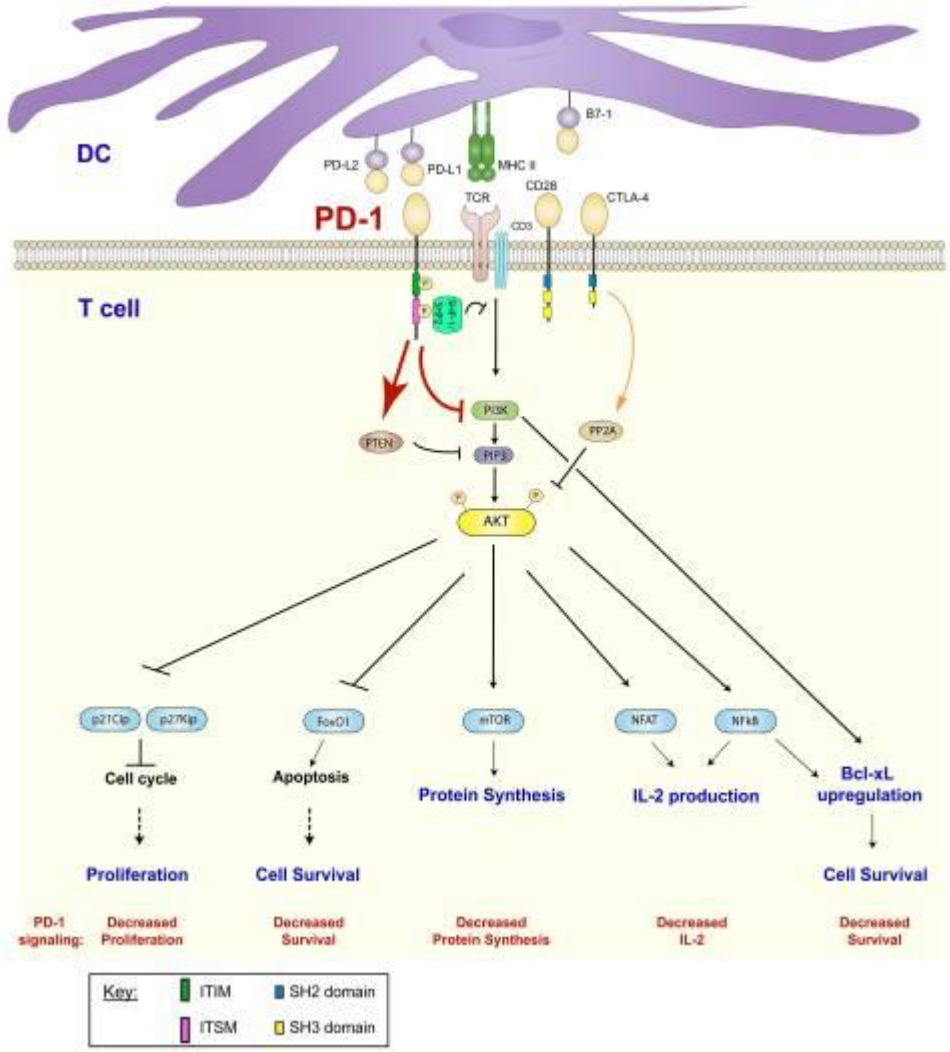


Figure 3. Voie de signalisation de PD-1 : l'engagement concomitant du TCR du LT (ici T Cell) et de PD-1 (ici sur les cellules dendritiques, DC) avec leurs ligands respectifs entraine au niveau de PD-1 la phosphorylation (P) des tyrosines des deux motifs ITIM et ITSM, et au recrutement subséquent de SHP-2 et/ou SHP-1. Ceci conduit à l'inhibition des signaux activateurs proximaux du complexe du TCR par déphosphorylation, et à l'augmentation de l'expression de PTEN. Au final, l'activation de la voie PI3K/Akt est atténuée ce qui peut aboutir à l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la survie du lymphocyte T, ainsi qu'à une diminution de la synthèse des protéines et la production des cytokines (les flèches et le texte en rouge indiquent la conséquence de la signalisation de PD-1) (84).

La signalisation de PD-1 est beaucoup mieux caractérisée dans le lymphocyte T que dans le lymphocyte B ou les monocytes et les cellules dendritiques.

L'effet inhibiteur de PD-1 sur l'activation du lymphocyte B s'exerce de manière comparable au lymphocyte T. PD-1 inhibe l'activation du lymphocyte B, sa prolifération ainsi que la sécrétion de l'IL-6 (cytokine importante pour le maintien du lymphocyte B). Cet effet est réversible par blocage de l'axe PD-1/PD-1 (63).

5. Rôle physiologique de PD-1 dans le maintien de la tolérance immune

PD-1 agit à plusieurs niveaux pour réguler et maintenir la tolérance immune. Au niveau central, la voie PD-1/PD-L1 semble pouvoir intervenir à différents stades du développement intra-thymique du LT pour influencer et réguler leur maturation (85,86). PD-1 participe à l'édification du répertoire des LT matures et au processus de la tolérance d'origine centrale, en influençant plusieurs étapes du développement intra-thymique des lymphocytes T.

En périphérie, PD-1 intervient dans le contrôle des clones auto-réactifs ayant survécu à la sélection négative. Comme précédemment décrit, PD-1 participe à la terminaison de la réponse immune: PD-1 abroge le signal activateur, limite l'expansion cellulaire ainsi que les fonctions effectrices.

PD-L1 étant largement exprimé au niveau tissulaire par des cellules non hématopoïétiques, cela permet à PD-1 de contrôler les LT auto-réactifs au stade effecteur et au niveau même de l'organe cible, et ce en empêchant leur réactivation *in situ* (71,87).

Ensemble, ces données montrent qu'en périphérie, PD-1 limite les réponses des LT auto-réactifs au niveau de deux sites anatomiques différents : le tissu lymphoïde et l'organe cible, et ce en contrôlant respectivement deux étapes différentes de leur différenciation: le stade naïf (au moment de l'initiation de la réponse immune) et le stade effecteur.

PD-1 apparait donc comme étant une molécule dotée d'une grande pléiotropie lui permettant de maintenir l'homéostasie immunitaire en agissant par différents mécanismes. Elle se distingue ainsi des autres co-récepteurs tels que le CTLA-4 par sa grande capacité à

influencer le comportement de plusieurs types de cellules immunitaires appartenant aussi bien au compartiment adaptatif qu'inné.

6. PD-1 et carcinogénèse

L'implication de PD-1 dans l'échappement tumoral à la réponse immunitaire a été suggérée par les modèles animaux et à présent confirmée dans différents cancers chez l'homme. De manière générale, dans certains cancers, les lymphocytes T infiltrant la tumeur expriment PD-1, et les cellules tumorales expriment le ou les ligands de PD-1 (PD-L1 et/ou PD-L2). La mise en jeu *in situ* de l'interaction de PD-1 avec ses ligands inhibe les fonctions cytotoxiques et sécrétrices de cytokines.

Ainsi, l'activation de la voie PD-1/PD-L1 va induire un microenvironnement immunosuppressif pouvant favoriser la croissance tumorale.

7. Rôle pronostique de PD-L1

L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales a été rapportée dans différents types de cancers, notamment dans les cancers du rein, de l'ovaire, de l'œsophage, bronchiques non à petites cellules et carcinomes épidermoïdes d'origine ORL (88–93).

La plupart des études mettent en évidence une forte corrélation entre l'expression de PD-L1 et un mauvais pronostic (90,92,94). Cependant dans les CCR il existe une étude rapportant une corrélation entre l'expression de PD-L1 et un meilleur pronostic (95).

8. Implications thérapeutiques

PD-1 et PD-L1 sont des cibles très prometteuses en immunothérapie (96). Le concept repose sur l'idée de restaurer une immunité anti-tumorale.

L'utilisation des anticorps monoclonaux anti-PD-1 et anti PD-L1, également appelés Inhibiteurs de check point immunitaires (ICIs), a récemment modifié les perspectives thérapeutiques de manière importante en oncologie. Les AC Anti-PD-1 ont déjà fait leurs preuves en termes d'efficacité et de tolérance dans la prise en charge des mélanomes, des cancers bronchiques et des carcinomes rénaux (97).

Les deux inhibiteurs les plus étudiés actuellement sont le Nivolumab et le Pembrolizumab qui sont des anti-PD-1.

9. Facteurs prédictifs de réponse au traitement

Il est crucial d'identifier des biomarqueurs afin de mieux sélectionner les patients pouvant bénéficier de ces immunothérapies.

L'expression de PD-1 et PD-L1 a été étudiée en tant que potentiel marqueur de réponse aux traitements anti-PD1 et PD-L1. Leur rôle en tant que facteur prédictif de réponse au traitement reste controversé. En effet, il a été mis en évidence une association entre le taux de réponse aux anti-PD-L1 (MPDL3280A) et l'expression de PD-L1 au niveau tumoral (98). De même, la réponse au Nivolumab est fortement corrélée à l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales (99). Au total, les patients exprimant PD-L1 au niveau tumoral semblent avoir de meilleurs taux de réponse au traitement. Cependant des réponses au traitement ont également été observées chez des patients n'exprimant pas PD-L1 (98).

Très récemment, il a été mis en évidence une augmentation du taux de réponse au Pembrolizumab dans les CCR de phénotype MSI, laissant suggérer que le statut MMR pourrait être considéré comme un facteur prédictif de réponse au traitement anti PD-1 (100). L'hypothèse reposerait sur la présence d'un nombre plus important de mutations somatiques (10 à 100 fois) par rapport aux tumeurs MSS.

Partie 4: ETUDE RETROSPECTIVE

1. Introduction/Objectifs de l'étude

1.1 Objectif principal

L'objectif principal de notre étude est l'évaluation de l'expression et de la valeur pronostique en terme de survie globale de PD-L1 dans les cancers colorectaux naïfs de tout traitement.

1.2 Objectifs secondaires

-L'évaluation de l'expression lymphocytaire de PD-1

-La caractérisation de l'infiltrat inflammatoire

-La comparaison entre l'expression de PD-L1 sur lame entière et sur tissu micro-array (TMA)

-L'évaluation de la corrélation entre l'expression de PD-L1 et PD-1

-L'évaluation de la corrélation entre l'expression de PD-L1 et l'intensité de l'infiltrat lymphocytaire

-L'évaluation de la corrélation entre l'expression de PD-L1 et CD8

-L'évaluation de la corrélation entre l'expression de PD-L1 et CD168

-L'évaluation de l'expression et de la valeur pronostique de PD-L1 en fonction du statut MMR

-Comparer l'expression de PD-L1 entre la tumeur primitive et la métastase, en cas de rechute métastatique.

2. Matériels et Méthodes

Il s'agit d'une étude observationnelle rétrospective et monocentrique menée à l'Institut Bergonié à Bordeaux.

2.1 Population

2.1.1 Critères d'inclusion

Patients naïfs de tout traitement et opérés à l'Institut Bergonié pour un cancer colo rectal entre juin 2008 et décembre 2013.

2.1.2 Critères d'exclusion

- Radiothérapie néoadjuvante
- Chimiothérapie néoadjuvante
- Antécédents d'autre cancer de moins de 5 ans

2.2 Critères de jugement

L'étude immunohistochimique a été réalisée à partir de blocs de matériel tumoral, fixé en formol et inclus en paraffine. Ces blocs ont fait l'objet de coupes sériées de 4µm d'épaisseur qui ont été montées sur lames de verre chargées positivement et qui ont servi pour l'étude immunohistochimique de l'expression de PD-L1 (sur lame entière) et l'évaluation de l'intensité de l'infiltrat inflammatoire.

Construction du TMA

La technique des tissue microarrays (TMAs) permet d'obtenir des profils d'expression protéiques par immunohistochimie (IHC) de plusieurs centaines de tumeurs disposées au sein d'un même bloc de paraffine grâce à la technique de fabrication mise au point par Kononen et al. en 1998 (101).

L'avantage de cette technique est de réduire la quantité d'anticorps utilisée, de traiter différentes coupes de tissus sur une même lame dans les mêmes conditions, et de pouvoir réaliser plusieurs coupes sériées successives, permettant ainsi de comparer l'expression de plusieurs anticorps sur des coupes histologiques virtuellement identiques.

Nous avons utilisé des blocs de TMAs construits dans le service de biopathologie par une technicienne de recherche (Valérie Velasco - VV). À partir des lames HES, les zones tumorales en périphérie, au contact de l'infiltrat inflammatoire ont été sélectionnées et cerclées par Gratiane Cogniet (GC) puis validées par le Docteur Isabelle Soubeyran (IS).

Les zones d'intérêt ont été prélevées en utilisant un « tissue arrayer » (Beecher Instruments Tissue Arrayer, Sun Prairie, WI), à partir des blocs en paraffine correspondants. Cet appareil est constitué d'une tourelle comportant 2 aiguilles. Une est destinée à prélever sur les différents blocs sélectionnés la zone d'intérêt (cylindre de 0,6 mm de diamètre). L'autre aiguille est destinée à former dans un bloc vierge, les différents trous où seront placés les différents cylindres tumoraux. Nous avons placé les prélèvements biopsiques en triple exemplaire (triplicate). Les différents blocs de paraffine nouvellement construits ont ensuite fait l'objet de coupes sériées, en utilisant un microtome classique. Les différentes coupes ont ensuite été déposées sur lames.

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur automate Benchmark®ULTRA (ROCHE - VENTANA) avec les Kits de détection UltraView Universal DAB (760-500) ou OptiView DAB IHC (760-700) selon le protocole des différents anticorps primaires utilisés (Tableau 1).

Lors de la mise au point de chaque anticorps, un témoin positif et négatif est réalisé pour optimiser la dilution, le démasquage antigénique et le temps d'incubation.

Tableau 1. Protocoles des différents anticorps primaires utilisés

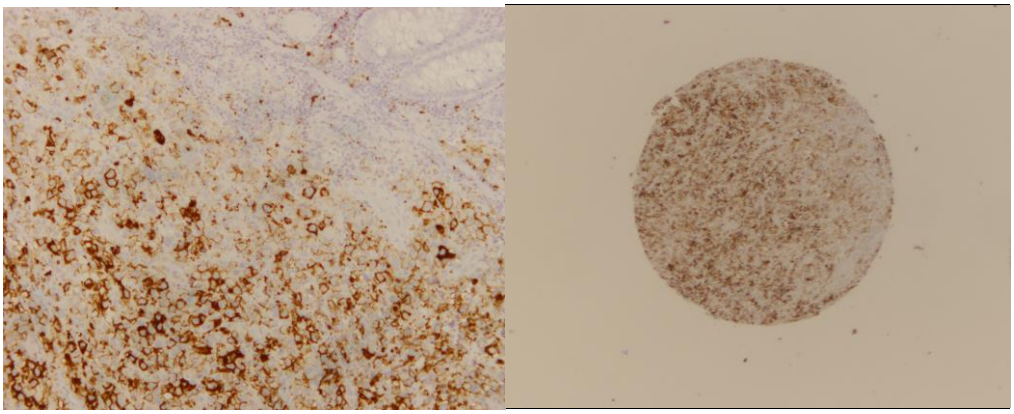
Anticorps	Clone	Dilution	Producteur	Démasquage	Temps incubation/ Révélation
CD3	2GV6	Prédilué	Ventana-CONFIRM-760-4341	CC1 standard	32 min (Ultraview)
CD8	C8/144B	1/25	Dako,Glostrup,Danemark	CC1 court	32 min (Ultraview)
CD68	PG-M1	1/50	Dako,Glostrup,Danemark	CC1 court	20 min (Ultraview)
CD163	10D6	1/100	Leica/Novocastra Laboratories, United Kingdom	CC1 court	32 min (Ultraview)
PD-L1/CD274	SP142	1/100	Spring Bioscience, CA, United States	CC1 standard	36 min (Optiview)
PD1	NAT	1/80	ABCAM, United Kingdom	CC1 standard	56 min (Ultraview)
MLH1	G168-15	1/60	BDPharmingen-550838-	CC1 (56')	52 min (Optiview)
MSH2	g219-1129	Prédilué	Ventana-760-4265-	CC1 (40')	40 min (Optiview)
MSH6	44	1/200	BDBiosciences-610918-	CC1 (48')	40 min (Optiview)
PMS2	EPR3947	Prédilué	Ventana-CellMarque-	CC1 (48')	40 min (Optiview)

La lecture des données d'IHC a été réalisée par GC et IS.

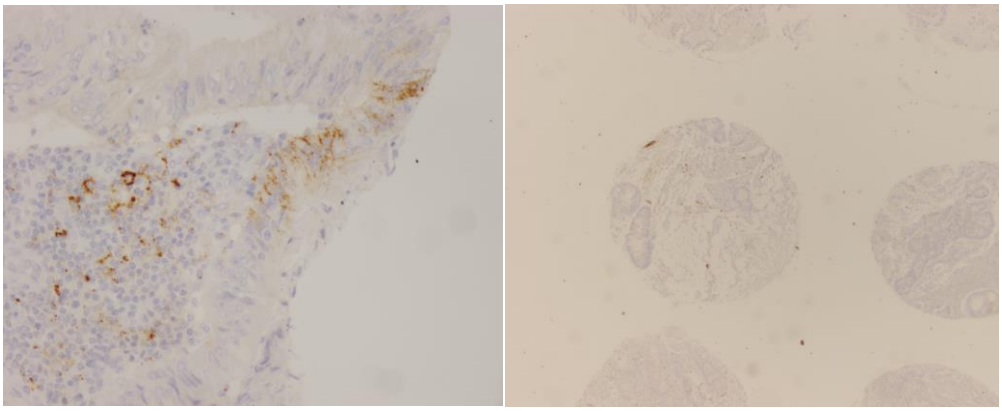
2.2.1 Critère de jugement principal

Le critère de jugement principal est l'expression de PD-L1.

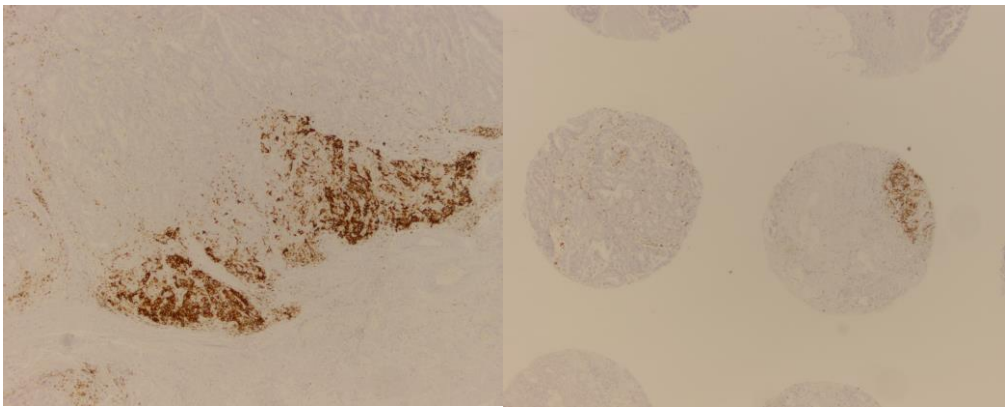
Le marquage immunologique de PD-L1 a été évalué sur lame entière et sur TMA afin de vérifier sa reproductibilité sur TMA. Il est exprimé en pourcentage de cellules marquées et nous avons retenu un seuil de positivité à 1% (figure 4).



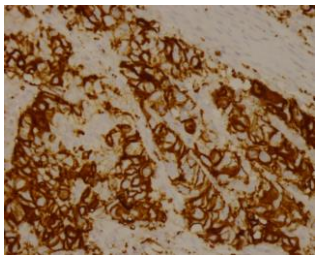
1A **1B**



2A **2B**



3A **3B**



3C

Figure 4. Marquage de PD-L1 sur CCR. Les panels A correspondent aux lames entières, et les panels B aux TMA pour le même cas. Le panel **3C** est un zoom du panel 3A sur la zone fortement positive.
1A et 1B : cas fortement positifs avec 80% cellules tumorales marquées sur lame entière et sur TMA.
2A et 2B : cas discordant, avec 2% cellules positives sur lame entière et négatif sur TMA.
3A et 3B : cas positifs avec 5% de cellules marquées sur lame entière et sur TMA, avec un marquage focalement intense.

2.2.2 Critères de jugement secondaires

a. PD-1

L'expression de PD-1 a été évaluée sur TMA en fonction de sa présence ou de son absence, avec un seuil de positivité à 1%.

b. Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire

Tout d'abord, nous avons évalué l'infiltrat lymphocytaire sur lame entière en fonction de son niveau d'intensité qui pouvait être minime, modéré ou intense.

Ensuite, nous avons évalué en IHC, sur TMA, l'expression de CD3 et CD8 (marqueurs lymphocytaires) et CD 68 et CD 163 (marqueurs macrophagiques), afin de caractériser plus précisément l'infiltrat inflammatoire. La mesure de ces différents facteurs immunologiques a été évaluée de façon semi-quantitative selon le pourcentage de cellules marquées en minime, modéré ou intense.

c. Phénotype MSI

La recherche d'une instabilité des microsatellites a été réalisée par technique d'immunohistochimie. Nous avons étudié l'expression des protéines MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PSM2). Une perte d'expression de l'une de ces protéines permet de conclure au phénotype MSI.

d. PD-L1 sur les sites métastatiques

L'étude de l'expression de PD-L1 a également été réalisée en IHC sur le matériel métastatique, lorsque celui-ci était disponible, afin d'être comparée à l'expression de PD-L1 sur la tumeur primitive.

2.3 Analyses statistiques

Les variables continues ont été décrites en terme de déviations standards, de médianes et d'intervalles.

Les variables qualitatives ont été décrites en terme de fréquences et de pourcentages.

Le recul médian a été calculé par la méthode de Kaplan Meier inversée. Le temps de participation a été calculé de la date de chirurgie à la date de décès ou des dernières nouvelles.

2.3.1 Analyse de survie

La survie globale a été calculée pour l'ensemble de la population selon la méthode de Kaplan Meier. Tous les décès, quelle qu'en soit la cause, sont considérés comme un évènement. La durée de participation est calculée de la date de la chirurgie à la date des dernières nouvelles ou du décès.

2.3.2 Analyse pronostique

L'analyse univariée de la survie globale a été calculée selon le modèle de Cox après vérification de l'hypothèse de proportionnalité par la méthode des résidus. Lorsque cette hypothèse n'était pas vérifiée l'interaction avec le temps était introduite dans le modèle, et les HR reportés ont été calculés à 3 ans.

L'analyse pronostique de la *survie sans rechute* dans la population non métastatique au diagnostic (M0) n'a pas été réalisée en raison du très faible nombre d'évènements (seulement 12) donnant des résultats sans précision avec des intervalles de confiance très larges.

2.3.3 Analyse de la reproductibilité du TMA

Afin d'évaluer la reproductibilité de l'utilisation du TMA dans l'analyse de l'expression de PD-L1, s'agissant du même marqueur mais testé sur deux supports différents, nous avons considéré la lecture sur lame entière comme étant le gold standard et nous avons calculé la sensibilité et spécificité de la lecture sur TMA.

2.3.4 Tests de corrélations des marqueurs avec l'expression de PD-L1

Pour étudier la corrélation entre l'expression de PD-L1 et les différents marqueurs d'IHC, nous avons utilisé le test du Chi_2 lorsque les effectifs le permettaient et dans le cas contraire après regroupement si nécessaire, nous avons utilisé le test de Fischer.

3. Résultats

3.1 Analyses descriptives

3.1.1 Caractéristiques de la population étudiée

Après analyse de la base de données des tumeurs de l'Institut Bergonié, 193 patients correspondaient à nos critères d'inclusion. Après exclusion des patients ayant reçu un traitement néoadjuvant ou ayant un antécédent de cancer de moins de 5 ans, 105 patients ont été retenus.

Les caractéristiques cliniques des 105 patients inclus sont rapportées dans le tableau suivant (Tableau 2).

Tableau 2. Caractéristiques clinico-pathologiques de la population de l'étude

Variables		N	%
Age, ans	**Médiane 71 (38-88)**	105	
Sexe	Masculin	62	59%
	Féminin	43	41%
T	T1	2	2%
	T2	7	7%
	T3	73	69%
	T4	23	22%
N	N0	47	45%
	N1	24	23%
	N2	33	31%
	Nx	1	1%
M	M0	83	79%
	M1	22	21%
Histologie	ADK lieberkhunien	100	95%
	ADK mucineux	3	3%
	Carcinome en cellules à bague à chaton	1	1%
	Carcinome indifférencié	1	1%
Grade histologique	Grade 1	10	9.5%
	Grade 2	85	81%
	Grade 3	10	9.5%
Emboles vasculo-nerveux	Absence	59	56%
	Présence	46	44%

3.1.2 Caractéristiques de la prise en charge

Tous les patients ont été opérés d'emblée. Dans 47% des cas, il n'y a pas eu de traitement adjuvant. Le détail des traitements complémentaires est rapporté dans le tableau ci-dessous. (Tableau 3)

Tableau 3. Descriptif des traitements reçus par la population de l'étude. (Chir TP = chirurgie de la tumeur primitive. Chimio= chimiothérapie. Chir Méta= chirurgie de la métastase. RCC= radio-chimiothérapie concomitante. RF=radiofréquence)

Variables	Nombre patients	%
Chir TP seule	49	47%
Chir TP + chimio	39	37%
Chir TP + Chir Méta + Chimio	13	12%
Chir TP + Chir Méta	1	1%
Chir TP + RCC	1	1%
Chir TP + Chir Méta + RCC	1	1%
Chir TP + RF + Chimio	1	1%

3.1.3 Expression des marqueurs

Le niveau d'expression des différents marqueurs immunologiques sur les pièces opératoires sont rapportés dans le tableau 4.

Tableau 4. Expression des marqueurs immunologiques sur pièce opératoire

Variable		Nombre	Pourcentage
PD-L1 sur lame entière	0	81	77%
	>=1	24	23%
PD-L1 sur TMA	0	90	86%
	>=1	15	14%
Infiltrat inflammatoire sur lame entière	Minime	83	79%
	Modéré	14	13%
	Intense	8	8%
PD-1 sur TMA	0	56	53%
	1	49	47%
Statut MMR sur TMA	MSS	88	84%
	MSI	17	16%
CD3 sur TMA	Minime	44	42%
	Modéré	51	49%
	Intense	10	9%
CD8 sur TMA	Minime	47	45%
	Modéré	49	47%
	Intense	9	8%
CD68 sur TMA	Minime	20	19%
	Modéré	57	54%
	Intense	28	27%
CD163 sur TMA	Minime	36	34%
	Modéré	56	53%
	Intense	13	13%

Parmi les 34 patients métastatiques (au diagnostic ou ayant présenté une rechute), nous disposions de matériel tumoral métastatique pour 17 d'entre eux, 8 parmi la population métastatique d'emblée et 9 parmi les patients ayant présenté une rechute. Nous avons donc étudié l'expression de PD-L1 chez ces 17 patients. Les résultats sont détaillés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Expression de PD-L1 chez les patients métastatiques sur site métastatique (Biopsie ou pièce opératoire)

Variable		Nombre	Pourcentage
PD-L1	0	14	82%
	>=1	3	18%

3.2 Analyse de survie

Le recul médian de la série est de 37.7 mois (IC95% : 27.3-47.2). Durant la période de suivi, 23 patients sont décédés et 12 ont présenté une rechute métastatique avec un délai médian de survenue de 14.1 mois (1.7-25.6).

La survie globale à 5 ans est de 67% (IC95% : 54-78). La survie sans rechute à 3 ans est de 81 % (IC95% : 69.6-89.2)

Tableau 6. Evolution durant la période de suivi

Variables		**Nombre patients**	**% de patients**
Statut	Vivant sans cancer	71	68%
	Vivant malade	6	6%
	Décès lié au cancer	16	15%
	Décès autres causes	7	7%
	Vivant autre cancer	1	1%
	Perdu de vue	1	1%
Rechute locale	Oui	4	4%
	Non	101	96%
Rechute métastatique	Oui	12	11%
	Non	93	89%

Figure 5. Courbe de survie globale selon la méthode Kaplan meier

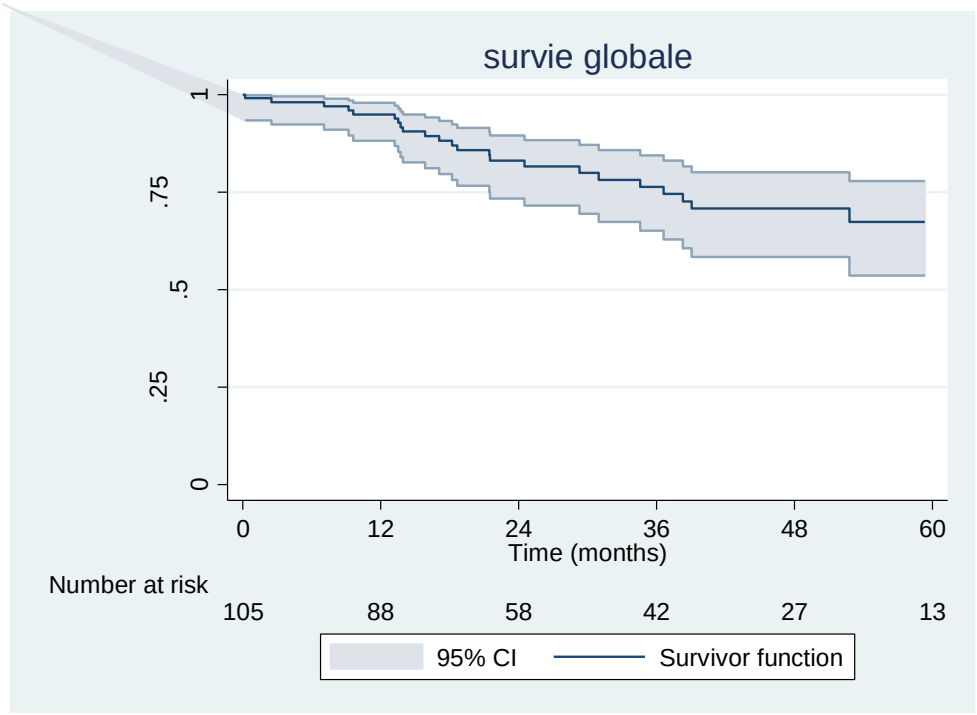
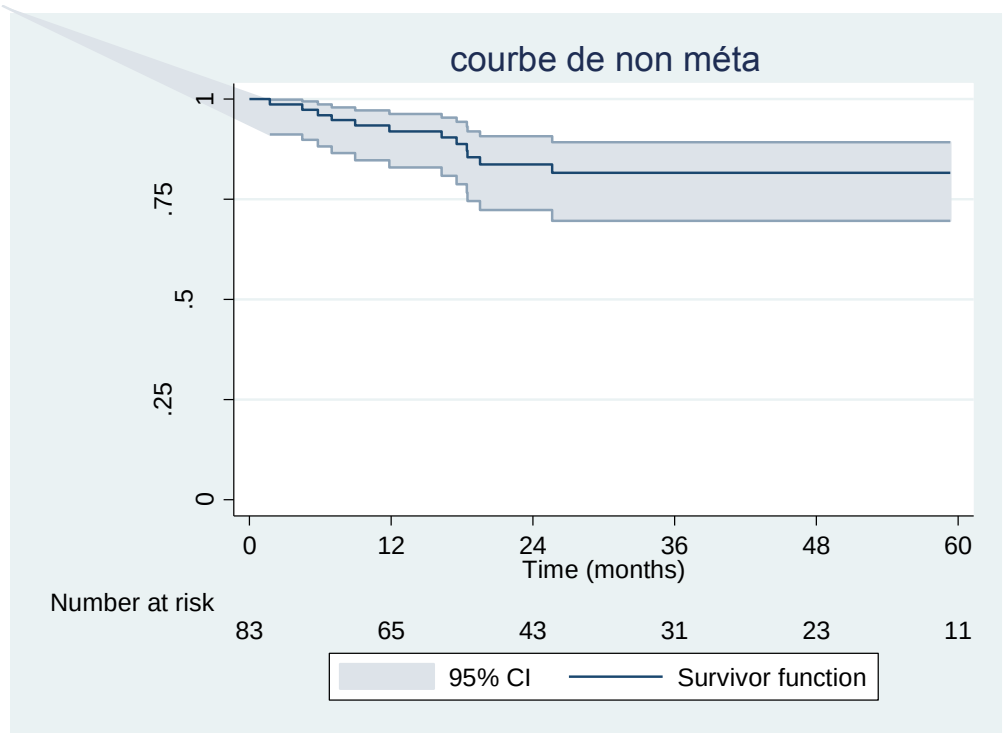


Figure 6. Courbe de survie sans rechute métastatique dans la population M0 au diagnostic



3.3 Analyses pronostiques

Tableau 7. Facteurs pronostiques de survie globale en analyse univariée

Parametres (N)		HR	IC 95%	P (Wald)
SEXE	**Hommes**	1	0.239-1.358	0,2045
	Femmes	0.570		
AGE	**<70 ans**	1	1.376-10.002	0,0096
	>=70ans	3.710		
T	**T3**	1		
	T1T2	0.748	0.097-5.799	0,7813
	T4	3.580	1.534-8.354	0,0032
N	**N0**	1		
	N1	3.411	0.815-14.287	0.0931
	N2	7.984	2.303-27.685	0.0011
M (au diagnostic)	**M0**	1	2.519-13.423	<0.001
	M+	5.815		
Grade	**Bas grade**	1	0.689-5.971	0.1996
	Haut grade	2.028		
Envah Vasc et/ou nerf	**Non**	1	3.8-70.3	0.0002
	Oui	16.4		

Paramètres (N)		HR	IC 95%	P (Wald)
PD-L1 lame	0	1	0.3-2.2	0.68
	>=1	0.8		
PD-L1 TMA	0	1	0.03 – 1.7	0.15
	>=1	0.23		
PD-1	0	1	0.108-1.964	0.2948
	>=1	0.460		
Statut MMR	0	1	0.108-1.964	0.2948
	1	0.460		
CD3	Minime	1		
	Modéré	0.158	0.053-0.471	< 0.001
	Intense	0.159	0.021-1.211	0.076
CD8	Minime	1		
	Modéré	0.231	0.085-0.627	0.004
	Intense	0.000	NC	0.99
CD68	Minime	1		
	Modéré	0.584	0.202-1.687	0.32
	Intense	0.706	0.220-2.261	0.56
CD163	Minime	1		
	Modéré	1.1	0.47-2.58	0.84
	Intense	0.29	0.04-2.32	0.25

En analyse univariée, le TNM, l'envahissement vasculo-nerveux, et l'âge sont des facteurs pronostiques significativement associés à la *survie globale*. Pour ce qui est des marqueurs en IHC, l'expression de PD-1, un infiltrat modéré ou intense de CD3 ou CD8 étaient également associés de manière significative à un meilleur pronostic en *survie globale* avec respectivement des HR à 0.264 (IC95% :0.09-0.776), 0.158 (IC95% : 0.053-0.471) et 0.231 (IC95% :0.085-0.627).

Ni l'expression de PD-L1, ni le statut MMR n'ont été retrouvés comme significativement associés à la survie globale.

Dans le sous-groupe MSS, il n'y a pas été mis en évidence de différence significative en terme de survie globale entre les patients PD-L1 positifs et PD-L1 négatifs, avec un p=0.9. Dans le groupe MSI, l'analyse pronostique ne permet pas de conclure en raison du faible nombre d'évènements (seulement 2 décès avec des sous-groupes de 8 et 9 patients)

Sensibilité et Spécificité du TMA pour l'expression de PD-L1

Nous avons mis en évidence 15 cas PD-L1 positifs sur TMA parmi les 24 cas positifs sur lames entières. La sensibilité est donc de 62,5%.

L'ensemble des cas négatifs pour l'expression de PD-L1 sur lames entières est également négatif sur TMA. La spécificité est donc de 100%.

Il n'y a aucun faux positif sur TMA, la VPP est donc de 100%, en revanche avec 9 faux négatifs la VPN est de 90% (81/81+9).

3.4 Analyses de corrélations

a.PD-L1 et infiltrat inflammatoire sur lame entière

Il existe une corrélation entre l'expression de PD-L1 et l'intensité de l'infiltrat inflammatoire (chi_2 *p<0,001*) avec 75% (6/8) des infiltrats intenses qui expriment PD-L1, alors que pour les infiltrats modérés il y a seulement 42.9% de PD-L1 positifs (6/14) et uniquement 14,5% des infiltrats minimes qui sont PD-L1 positifs (12/83).

b. PD-L1 et PD-1

Une corrélation a également été établie entre l'expression de PD-1 et PD-L1, (chi_2 *p=0,007*) avec 87,5% des PD-1 négatifs qui sont PD-L1 négatifs et 70% des PD-L1 positifs qui sont également PD-1 positifs. En revanche il n'y a que 34,7% des PD-1 positifs qui sont PD-L1 positifs.

c. PD-L1 et statut MMR

Il semble qu'il y ait une association entre le statut MMR et l'expression de PD-L1 (Fischer *p=0,003*) avec une proportion plus importante de MSI parmi les PD-L1 positifs par rapport aux PD-L1 négatifs. En effet, 37% des cas PD-L1 positifs sont MSI contre seulement 10% parmi les PD-L1 négatifs. Et parmi les MSI, 47% sont PD-L1 négatifs et 53% sont PD-L1 positifs.

d. PD-L1 et CD8

Nous avons mis en évidence une corrélation entre l'intensité d'expression de CD8 et l'expression de PD-L1 (chi_2 *p<0,001*) avec 77% des infiltrats CD8 intenses qui exprimaient PD-L1.

e.PD-L1 et CD163

Seulement 7% des PD-L1 négatifs présentaient une expression intense de CD163 contre 30% chez les PD-L1 positifs (chi_2 *p=0,003*).

f. Expression de PD-L1 sur site métastatique

Nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre l'expression de PD-L1 sur la tumeur primitive et sur le site métastatique. En effet, parmi les 3 cas positifs sur la métastase, aucun n'était positif sur la tumeur primitive et parmi les 4 cas positifs sur la tumeur primitive aucun n'exprimait PD-L1 sur le site métastatique (Tableau 8).

Tableau 8 : Expression de PD-L1 sur tumeur primitive et site métastatique

		Tumeur primitive		TOTAL
	PD-L1	**0**	**>=1**	
Métastase	**0**	10	4	14
	>=1	3	0	3
	TOTAL	13	4	

4. Discussion

Expression de PD-L1

Avec seulement 23% de cas PD-L1 positifs, le taux est inférieur à ceux des précédentes études. En effet, Dong et al. (102) trouvaient 53% de PD-L1 positifs dans les CCR. Un peu plus tard, Droeser et al. (95) ont eux aussi étudié l'expression de PD-L1 chez 1420 cas de CCR et ont mis en évidence une positivité dans 36% et 29% respectivement chez les patients MSS et MSI. Dans d'autres types de tumeurs digestives, plus particulièrement dans les cancers de l'œsophage, de l'estomac ou du pancréas, une expression de PD-L1 était retrouvée dans 30 à 50 % des cas (90,103).

Ces différences de taux d'expression peuvent être liées à l'utilisation de différents marqueurs de PD-L1 en IHC. En effet des seuils de détection ou une qualité du marquage variable peuvent entrainer des taux de détection variables. Droeser et al. retrouvent une positivité de la muqueuse colique saine suggérant que les Ac ou les techniques d'IHC utilisés ne sont pas assez spécifiques. Nous avons attaché une attention particulière à la sélection d'un marqueur nous semblant le plus performant, spécifique et le plus reproductible possible.

La question du seuil de positivité utilisé se pose aussi. Il est rarement spécifié dans les différentes études retrouvées dans la littérature. Nous avons choisi de fixer un seuil de positivité à 1% car nous estimions avoir un marqueur fiable avec une bonne spécificité.

Il faut également noter qu'il existe une notion d'expression dynamique de PD-L1 qui peut faire varier son taux de positivité.

Rôle pronostique de PD-L1

Notre étude n'a malheureusement pas permis de retrouver d'impact pronostique, favorable ou défavorable, à l'expression de PD-L1. Ceci peut en partie être lié au faible effectif de notre population et également au faible nombre de cas PD-L1 positifs. Cela ne nous permet

pas de nous positionner face à l'une ou l'autre des 2 études contradictoires qui existent dans les CCR (94,95).

Mais on peut se poser la question de la reproductibilité de l'utilisation du marqueur IHC de PD-L1 dans ces deux études. Par ailleurs, l'étude de l'expression de PD-L1 a été effectuée sur TMA dans l'une de ces études. D'autre part, l'équipe de Droeser et al. (95) n'a mis en évidence un rôle protecteur que dans le sous-groupe MSI.

En revanche, les facteurs pronostiques classiques ont pu être mis en évidence dans notre étude, à savoir le stade TNM et la présence d'emboles vasculo-nerveux.

Rôle pronostique de PD-1

De façon intéressante nous avons retrouvé un rôle pronostique favorable à l'expression de PD-1 au sein de l'infiltrat inflammatoire. Cet aspect est peu étudié dans la littérature. L'expression de PD-1 serait alors le résultat d'un rétrocontrôle négatif, secondaire à une réponse immunitaire anti-tumorale adaptative initiale efficace, ce qui pourrait expliquer son impact pronostic positif. Cependant même s'il existe une corrélation entre PD-1 et PD-L1, nous avons montré dans notre étude que seulement 34,7% des cas PD-1 positifs étaient également PD-L1 positifs.

Corrélation entre l'expression sur lame entière par rapport au TMA

L'un des points intéressants de notre étude, et qui nous démarque des précédentes études, concerne l'utilisation du TMA par rapport au marquage sur lame entière de PD-L1. La sensibilité n'est que de 62%, avec une spécificité de 100%. Avec donc 38% de faux négatifs, l'utilisation du TMA, c'est-à-dire d'un échantillon minime de tumeur, ne nous semble pas une méthode fiable et reproductible dans la situation bien précise de l'évaluation de l'expression de PD-L1. Ceci s'explique par le fait que PD-L1 ne s'exprime que sur un pourcentage très faible de cellules tumorales. Ce phénomène peut également être lié à une expression dynamique de PD-L1. Cela pose également le problème de l'évaluation de l'expression de PDL1 sur micro biopsie qui n'aura de valeur que positive.

En dehors de l'analyse pronostique de PD-L1, nous avons étudié la **corrélation** entre l'expression de PD-L1 et différents marqueurs utilisés dans notre étude.

Il semble clairement y avoir un lien entre l'importance de **l'infiltrat inflammatoire et l'expression de PD-L1**. L'infiltrat lymphocytaire est plus marqué chez les patients PD-L1 positifs. L'expression tumorale de PD-L1 semble donc augmentée en situation inflammatoire importante. Cette information est intéressante dans la mesure où l'on sait que l'infiltrat inflammatoire est associé à un meilleur pronostic dans les CCR. L'expression de PD-L1 pourrait être augmentée en réaction à une réponse inflammatoire anti-tumorale importante.

Corrélation MMR/PD-L1

La corrélation entre le phénotype MSI et le statut PD-L1 positif retrouvée dans notre étude semble très prometteuse et rejoint les différentes données de la littérature avec notamment l'hypothèse que le système immunitaire est fortement stimulé dans les cancers MSI (104).

Cette idée a été appuyée récemment par une étude qui s'est intéressée au microenvironnement tumoral dans les CCR MSI. Il a été mis en évidence une forte expression des différents points de contrôle (check point) immunitaires tels que PD-1 ou CTLA-4 (105), indiquant que l'infiltrat immunitaire intense du microenvironnement tumoral est contrebalancé par la présence de signaux inhibiteurs.

Ces données sont intéressantes en pratique clinique. En effet cela pourrait permettre d'identifier un sous-groupe de patients potentiellement meilleurs répondeurs aux traitements anti-PD-1/PD-L1 dans la mesure où l'expression de PD-L1 semble être un bio-marqueur de réponse au traitement. Ce d'autant que les CCR métastatiques (CCRm) MSI semble de plus mauvais pronostic que les CCRm MSS (notamment lorsqu'ils sont associés à une mutation BRAF) (106), à l'inverse de ce qui est observé dans les stades non métastatiques.

Cela rejoint les résultats l'étude de Le Dut et al. (100), parue récemment, qui a mis en évidence un meilleur taux de réponse aux anti-PD-1 (Pembrolizumab) dans la population des patients de phénotype MSI (98). Il s'agit de la première étude guidée par un bio-marqueur

génétique tumoral. Les résultats préliminaires présentés à l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) 2015 montrent des taux de réponse objective (RO) et de contrôle tumoral importants, (RO de 62% chez les MSI avec un taux de contrôle à 92%), avec de longs répondeurs comme souvent en immunothérapie. L'hypothèse des auteurs afin d'expliquer ce meilleur taux de réponse chez les patients MSI repose sur la présence d'un nombre plus important de mutations. Les gènes mutés encodent pour des protéines anormales, dont la conformation est modifiée, qui sont autant de néo-épitopes pouvant être reconnus et ciblés par le système immunitaire. L'impact du nombre de mutations tumorales sur l'efficacité du blocage thérapeutique des check point immunitaires avait déjà été montré avec l'Ipilimumab (Anti-CTLA-4) dans le mélanome (107) et avec le même Pembrolizumab dans le cancer bronchique non à petites cellules (108).

Expression de PD-L1 sur la tumeur primitive versus métastase

Nous n'avons mis en évidence aucune corrélation entre l'expression de PD-L1 sur la tumeur primitive et sur le site métastatique. Cela nous conforte dans l'idée qu'il doit exister une expression dynamique de PD-L1 dans le temps et dans l'espace. Cette expression peut également avoir été influencée par les différents traitements. En effet, parmi les 17 patients métastatiques pour lesquels nous disposions de matériel tumoral, 60% avaient reçu un traitement à base de chimiothérapie avant la biopsie ou l'exérèse de la métastase. Hors, pour l'étude de l'expression de PD-L1 sur la tumeur primitive, nous avions sélectionné des patients n'ayant reçu aucun traitement au préalable. L'interprétation de l'expression de PD-L1 sur les sites métastatiques est donc plus difficile car biaisée.

5. Conclusion

Le micro environnement tumoral inflammatoire joue un rôle essentiel dans l'évolution tumorale des CCR. Le caractériser est donc une étape importante dans la prise en charge de ce type de tumeurs, notamment avec l'essor récent de l'immunothérapie. Le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 est en plein développement avec d'ores et déjà une AMM dans les mélanomes de stades avancés ou le cancer du poumon non à petites cellules. PD-L1 apparait comme un bio-marqueur intéressant. Plus récemment le statut MSI a été mis en exergue. Notre étude n'a pas permis de retrouver d'impact pronostique à l'expression de PD-L1, mais son récepteur, PD-1, semblerait être associé à un meilleur pronostic, pouvant traduire un rétrocontrôle négatif secondaire à une réaction immunitaire anti-tumorale adaptative.

Il serait donc intéressant d'étendre l'évaluation de PD-L1 à une cohorte plus importante, mais en la réalisant sur lame entière et non sur TMA, en caractérisant le statut MSI et en la corrélant à la réponse à l'immunothérapie dans le cadre d'un essai thérapeutique.

Références

1. Binder-Foucard F, Bossard N, Delafosse P, Belot A, Woronoff A-S, Remontet L. Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: solid tumors. Rev Epidemiol Sante Publique. 2014 Apr;62(2):95–108.

2. Bouvier. Epidémiologie descriptive du cancer colorectal en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire. 2009 Jan;pp 14–6.

3. Bouvier A-M, Launoy G. [Epidemiology of colorectal cancer]. Rev Prat. 2015 Jun;65(6):767–73.

4. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jougla E, Benhamou E, Delafosse P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. Rev Epidemiol Sante Publique. 2008 Jun;56(3):159–75.

5. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. N Engl J Med. 2002 Nov 14;347(20):1593–603.

6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646–74.

7. Laurent-Puig P, Agostini J, Maley K. [Colorectal oncogenesis]. Bull Cancer. 2010 Nov;97(11):1311–21.

8. Boige V, Malka D, Taieb J, Pignon J-P, Ducreux M. [Colorectal cancer: prognostic molecular markers]. Gastroenterol Clin Biol. 2004 Jan;28(1):21–32.

9. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology. 2008 Oct;135(4):1079–99.

10. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. Nat Rev Cancer. 2001 Oct;1(1):55–67.

11. Michor F, Iwasa Y, Vogelstein B, Lengauer C, Nowak MA. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? Semin Cancer Biol. 2005 Feb;15(1):43–9.

12. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. Nat Rev Cancer. 2003 Sep;3(9):695–701.

13. Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3’ exons of TACSTD1. Nat Genet. 2009 Jan;41(1):112–7.

14. Niessen RC, Kleibeuker JH, Westers H, Jager POJ, Rozeveld D, Bos KK, et al. PMS2 involvement in patients suspected of Lynch syndrome. Genes Chromosomes Cancer. 2009 Apr;48(4):322–9.

15. van Roon EHJ, van Puijenbroek M, Middeldorp A, van Eijk R, de Meijer EJ, Erasmus D, et al. Early onset MSI-H colon cancer with MLH1 promoter methylation, is there a genetic predisposition? BMC Cancer. 2010;10:180.

16. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. Cancer Res. 2002 May 1;62(9):2447–54.

17. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3740–5.

18. Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku S-L, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. Gastroenterology. 2002 May;122(5):1376–87.

19. Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2003 Aug 1;9(8):2898–903.

20. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. J Clin Oncol. 2010 Jan 10;28(2):264–71.

21. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, et al. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Francaise de Chirurgie. Cancer. 1996 Apr 1;77(7):1254–62.

22. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. N Engl J Med. 2000 Jan 13;342(2):69–77.

23. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. J Clin Oncol. 2010 Jul 10;28(20):3219–26.

24. Vauthey J-N, Zimmitti G, Kopetz SE, Shindoh J, Chen SS, Andreou A, et al. RAS mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. Ann Surg. 2013 Oct;258(4):619–26; discussion 626–7.

25. Peeters M, Douillard J-Y, Van Cutsem E, Siena S, Zhang K, Williams R, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. J Clin Oncol. 2013 Feb 20;31(6):759–65.

26. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, Julie C, Zaanan A, Tabernero J, et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. Ann Oncol. 2014 Dec;25(12):2378–85.

27. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med. 2008 Oct 23;359(17):1757–65.

28. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008 Apr 1;26(10):1626–34.

29. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJA. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2009 Jul 2;361(1):98–9.

30. Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, Masi G, Sensi E, Schirripa M, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer. 2014 Jan;50(1):57–63.

31. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med. 2005 Dec 22;353(25):2654–66.

32. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.

33. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002 Dec 19;420(6917):860–7.

34. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer. 2004 Jan;4(1):71–8.

35. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol. 2004;22:329–60.

36. Tobon GJ, Izquierdo JH, Canas CA. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. Autoimmune Dis. 2013;2013:827254.

37. Mackay IR. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. BMJ. 2000 Jul 8;321(7253):93–6.

38. Bretscher P. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. Immunol Today. 1992 Feb;13(2):74–6.

39. Stuart RW, Racke MK. Targeting T cell costimulation in autoimmune disease. Expert Opin Ther Targets. 2002 Jun;6(3):275–89.

40. Mueller DL. T cells: A proliferation of costimulatory molecules. Curr Biol. 2000 Mar 23;10(6):R227–30.

41. Henry J, Miller MM, Pontarotti P. Structure and evolution of the extended B7 family. Immunol Today. 1999 Jun;20(6):285–8.

42. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. J Exp Med. 1992 Dec 1;176(6):1595–604.

43. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. Nature. 1987 Jul 16;328(6127):267–70.

44. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol. 2007 Jul;19(7):813–24.

45. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. Nat Rev Cancer. 2006 Jan;6(1):24–37.

46. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002 Nov;3(11):991–8.

47. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992 Nov;11(11):3887–95.

48. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics. 1994 Oct;23(3):704–6.

49. Finger LR, Pu J, Wasserman R, Vibhakar R, Louie E, Hardy RR, et al. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. Gene. 1997 Sep 15;197(1-2):177–87.

50. Shlapatska LM, Mikhalap SV, Berdova AG, Zelensky OM, Yun TJ, Nichols KE, et al. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the. J Immunol. 2001 May 1;166(9):5480–7.

51. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med. 2000 Oct 2;192(7):1027–34.

52. Zhang X, Schwartz J-CD, Guo X, Bhatia S, Cao E, Lorenz M, et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. Immunity. 2004 Mar;20(3):337–47.

53. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. Int Immunol. 1996 May;8(5):765–72.

54. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang I-M, Marquette K, Lowe D, et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and. J Immunol. 2003 Jan 15;170(2):711–8.

55. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. J Immunol. 2004 Jul 15;173(2):945–54.

56. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677–704.

57. Oestreich KJ, Yoon H, Ahmed R, Boss JM. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. J Immunol. 2008 Oct 1;181(7):4832–9.

58. Austin JW, Lu P, Majumder P, Ahmed R, Boss JM. STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF regulate PD-1 through multiple novel regulatory regions in murine T cells. J Immunol. 2014 May 15;192(10):4876–86.

59. Mathieu M, Cotta-Grand N, Daudelin J-F, Thebault P, Labrecque N. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8(+) T-cell activation. Immunol Cell Biol. 2013 Jan;91(1):82–8.

60. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med. 1999 Dec;5(12):1365–9.

61. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol. 2001 Mar;2(3):261–8.

62. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. J Exp Med. 2001 Apr 2;193(7):839–46.

63. Thibult M-L, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Just-Landi S, Xerri L, et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. Int Immunol. 2013 Feb;25(2):129–37.

64. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang I-M, Marquette K, Lowe D, et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and. J Immunol. 2003 Jan 15;170(2):711–8.

65. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. J Immunol. 2008 Nov 15;181(10):6738–46.

66. Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, Chen L, Hartung H-P, Weller M, et al. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2004 Oct;155(1-2):172–82.

67. Wang S-F, Fouquet S, Chapon M, Salmon H, Regnier F, Labroquere K, et al. Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors. PLoS One. 2011;6(3):e17621.

68. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. Immunity. 2007 Jul;27(1):111–22.

69. Butte MJ, Pena-Cruz V, Kim M-J, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. Mol Immunol. 2008 Aug;45(13):3567–72.

70. Martin-Orozco N, Wang Y-H, Yagita H, Dong C. Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8+ T cell tolerance to tissue antigens. J Immunol. 2006 Dec 15;177(12):8291–5.

71. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. J Exp Med. 2006 Apr 17;203(4):883–95.

72. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. Eur J Immunol. 2002 Mar;32(3):634–43.

73. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. Annu Rev Immunol. 2005;23:515–48.

74. Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor. Immunol Lett. 2002 Oct 21;84(1):57–62.

75. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. J Immunol. 2002 Nov 15;169(10):5538–45.

76. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. Eur J Immunol. 2003 Oct;33(10):2706–16.

77. Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 29;100(9):5336–41.

78. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 20;98(24):13866–71.

79. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. J Exp Med. 2012 Jun 4;209(6):1201–17.

80. Sheppard K-A, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. FEBS Lett. 2004 Sep 10;574(1-3):37–41.

81. Patsoukis N, Li L, Sari D, Petkova V, Boussiotis VA. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. Mol Cell Biol. 2013 Aug;33(16):3091–8.

82. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. Mol Cell Biol. 2005 Nov;25(21):9543–53.

83. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. Sci Signal. 2012 Jun 26;5(230):ra46.

84. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunol Rev. 2010 Jul;236:219–42.

85. Nishimura H, Honjo T, Minato N. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. J Exp Med. 2000 Mar 6;191(5):891–8.

86. Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, Imamura S, Minato N, et al. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. Int Immunol. 1996 May;8(5):773–80.

87. Keir ME, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. J Immunol. 2007 Oct 15;179(8):5064–70.

88. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. Nat Med. 2003 May;9(5):562–7.

89. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. Clin Cancer Res. 2004 Aug 1;10(15):5094–100.

90. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. Clin Cancer Res. 2005 Apr 15;11(8):2947–53.

91. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. Cancer Res. 2003 Oct 1;63(19):6501–5.

92. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. Cancer. 2005 Nov 15;104(10):2084–91.

93. Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Meyermann R, et al. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. Cancer Res. 2003 Nov 1;63(21):7462–7.

94. Shi S-J, Wang L-J, Wang G-D, Guo Z-Y, Wei M, Meng Y-L, et al. B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. PLoS One. 2013;8(10):e76012.

95. Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. Eur J Cancer. 2013 Jun;49(9):2233–42.

96. Robert C, Soria J-C, Eggermont AMM. Drug of the year: programmed death-1 receptor/programmed death-1 ligand-1 receptor monoclonal antibodies. Eur J Cancer. 2013 Sep;49(14):2968–71.

97. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. 2012 Jun 28;366(26):2443–54.

98. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. 2014 Nov 27;515(7528):563–7.

99. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin Cancer Res. 2014 Oct 1;20(19):5064–74.

100. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med. 2015 Jun 25;372(26):2509–20.

101. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med. 1998 Jul;4(7):844–7.

102. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med. 2002 Aug;8(8):793–800.

103. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007 Apr 1;13(7):2151–7.

104. Bodmer W, Bishop T, Karran P. Genetic steps in colorectal cancer. Nat Genet. 1994 Mar;6(3):217–9.

105. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. Cancer Discov. 2015 Jan;5(1):43–51.

106. Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). Ann Oncol. 2014 May;25(5):1032–8.

107. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. N Engl J Med. 2014 Dec 4;371(23):2189–99.

108. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science. 2015 Apr 3;348(6230):124–8.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les moeurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses; Que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.

Titre : Evaluation de l'expression et de la valeur pronostique de PD-L1 dans les cancers colorectaux traités par chirurgie première

RESUME :

Objectif : Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) est surexprimé dans différents types de tumeurs. Sa liaison avec PD-1 inhibe l'activation des lymphocytes T, bloquant ainsi l'immunité anti-tumorale. L'objectif de notre étude est d'évaluer l'expression de PD-L1 dans les cancers colorectaux (CCR) et d'étudier son impact pronostique qui reste controversé dans ce type de tumeur. Nous avons également étudié le microenvironnement tumoral afin de mieux le caractériser.

Matériels et méthodes : Nous avons inclus 105 patients, traités entre juin 2008 et décembre 2013, à l'Institut Bergonié, pour un CCR, opérés d'emblée. L'expression de PD-L1 a été évaluée en immunohistochimie, selon le pourcentage de cellules positives, sur lame entière mais également sur tissue micro array (TMA), afin de comparer les 2 méthodes. Nous avons également étudié l'expression sur TMA de PD-1, CD3, CD8, CD 68 et CD 163. Des corrélations ont été établies entre l'expression de PD-L1 et l'infiltrat inflammatoire.

Résultats : Une expression tumorale de PD-L1 a été retrouvée dans 23% des cas, sans impact sur le pronostic en terme de survie globale (HR=0.8, IC95% : 0.3-2.2), ni dans la population globale de l'étude, ni dans les sous-groupes en fonction du statut micro satellitaire. L'utilisation du TMA n'a permis de détecter que 62.5% des PD-L1 positifs par rapport à l'étude sur lame entière. L'expression de PD-L1 est corrélée à l'importance de l'infiltrat inflammatoire et notamment avec une forte expression de CD8 et de CD 163.

Conclusion : Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence d'impact pronostique de l'expression de PD-L1 dans les CCR. Il semble y avoir une corrélation entre l'expression de PD-L1 et le phénotype MSI. Par ailleurs, notre étude a permis de montrer que l'utilisation du TMA ne semblait pas fiable pour évaluer l'expression de PD-L1 dans les CCR.

Discipline : Oncologie médicale

Mots clés : Cancers colorectaux, PD-L1, facteurs pronostiques, instabilité microsatellitaire, tissue micro arrays.