HAL
open science

Impact de l'expression immunohistochimique de PD-L1 et des lymphocytes CD8 positifs intratumoraux sur le pronostic et la réponse aux traitements : analyse combinée à partir de 105 mélanomes malins primitifs et métastatiques

Coraline Bence

To cite this version:

Coraline Bence. Impact de l'expression immunohistochimique de PD-L1 et des lymphocytes CD8 positifs intratumoraux sur le pronostic et la réponse aux traitements : analyse combinée à partir de 105 mélanomes malins primitifs et métastatiques. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01950233

HAL Id: dumas-01950233

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01950233v1

Submitted on 10 Dec 2018

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 de Nice Sophia Antipolis

FACULTÉ DE MÉDECINE

THESE D'EXERCICE DE MEDECINE

POUR LE

DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Impact de l'expression immunohistochimique de PD-L1 et des lymphocytes CD8 positifs intratumoraux sur le pronostic et la réponse aux traitements. Analyse combinée à partir de 105 mélanomes malins primitifs et métastatiques

---

SOUTENUE ET PRÉSENTÉE PUBLIQUEMENT À
NICE LE 21 SEPTEMBRE 2017

PAR

CORALINE BENCE

NÉE LE 11 AVRIL 1988 À NICE

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL HOFMAN, PRÉSIDENT DU JURY

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-PHILIPPE LACOUR

MONSIEUR LE PROFESSEUR THIERRY PASSERON

MONSIEUR LE DOCTEUR EMMANUEL CHAMOREY

MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN-FRANCOIS ROUSSEL

MONSIEUR LE DOCTEUR IOANNIS LIOLIOS

MADAME LE DOCTEUR VERONIQUE HOFMAN, DIRECTRICE DE THÈSE

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Université Nice Sophia Antipolis

Faculté de Médecine

Liste des professeurs au 1er septembre 2017 à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen	**M. BAQUÉ Patrick**
Vice-Doyen	M. BOILEAU Pascal
Assesseurs	M. ESNAULT Vincent M DELLAMONICA Jean Mme BREUIL Véronique M. MARTY Pierre
Conservateur de la bibliothèque	Mme AMSELLE Danièle
Directrice administrative des services	Mme CALLEA Isabelle
Doyens Honoraires	M. AYRAUD Noël M. RAMPAL Patrick M. BENCHIMOL Daniel

Professeurs Honoraires

M ALBERTINI Marc
M. BALAS Daniel
M. BATT Michel
M. BLAIVE Bruno
M. BOQUET Patrice
M. BOURGEON André
M. BOUTTÉ Patrick
M. BRUNETON Jean-Noël
Mme BUSSIERE Françoise
M. CAMOUS Jean-Pierre
M. CANIVET Bertrand
M. CASSUTO Jill-patrice
M. CHATEL Marcel
M. COUSSEMENT Alain
Mme CRENESSE Dominique
M. DARCOURT Guy
M. DELLAMONICA Pierre
M. DELMONT Jean
M. DEMARD François
M. DESNUELLE Claude
M. DOLISI Claude
M . FRANCO Alain
M. FREYCHET Pierre
M. GÉRARD Jean-Pierre
M. GILLET Jean-Yves
M. GRELLIER Patrick
M. GRIMAUD Dominique
M. HARTER Michel
M. INGLESAKIS Jean-André
M. JOURDAN Jacques
M. LALANNE Claude-Michel
M. LAMBERT Jean-Claude
M. LAZDUNSKI Michel
M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. LE FICHOUX Yves
Mme LEBRETON Elisabeth
M. LOUBIERE Robert
M. MARIANI Roger
M. MASSEYEFF René
M. MATTEI Mathieu
M. MOUIEL Jean
Mme MYQUEL Martine
M. ORTONNE Jean-Paul
M. PRINGUEY Dominique
M. SAUTRON Jean Baptiste
M. SCHNEIDER Maurice
M. TOUBOL Jacques
M. TRAN Dinh Khiem
M VAN OBBERGHEN Emmanuel
M. ZIEGLER Gérard

Liste des professeurs au 1er septembre 2017 à la Faculté de Médecine de Nice

M.C.A. Honoraire

Mlle ALLINE Madeleine

M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques
M. BASTERIS Bernard
Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie
Mme DONZEAU Michèle
M. EMILIOZZI Roméo
M. FRANKEN Philippe
M. GASTAUD Marcel
M. GIUDICELLI Jean
M. MAGNÉ Jacques
Mme MEMRAN Nadine
M. MENGUAL Raymond
M. PHILIP Patrick
M. POIRÉE Jean-Claude
Mme ROURE Marie-Claire

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Université Nice Sophia Antipolis

Faculté de Médecine

Liste des professeurs au 1er septembre 2017 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
Mme	EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M.	FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction (54.05)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GASTAUD Pierre	Ophtalmologie (55.02)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
Mme	ICHAI Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénéréologie (50.03)
M.	LEFTHERIOTIS Geogres	Physiologie- médecine vasculaire
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M.	QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	TRAN Albert	Hépato Gastro-entérologie (52.01)

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Université Nice Sophia Antipolis

Faculté de Médecine

Liste des professeurs au 1er septembre 2017 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M.	PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M.	THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Université Nice Sophia Antipolis

Faculté de Médecine

Liste des professeurs au 1er septembre 2017 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

Mme	ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	ANTY Rodolphe	Gastro-entérologie (52.01)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BAILLIF Stéphanie	Ophtalmologie (55.02)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
M.	CARLES Michel	Anesthésiologie Réanimation (48.01)
M.	CHEVALIER Nicolas	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
Mme	CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M.	CLUZEAU Thomas	Hématologie (47.01)
M.	DELLAMONICA Jean	réanimation médicale (48.02)
M.	DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M.	FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
Mlle	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M	JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)
M.	LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénéréologie (50-03)
M.	ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M.	ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M.	ROUX Christian	rhumatologie (50.01)
M.	RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M.	SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M.	TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	VENISSAC Nicolas	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Université Nice Sophia Antipolis

Faculté de Médecine

Liste des professeurs au 1er septembre 2017 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

M.	HOFLIGER Philippe	Médecine Générale (53.03)

MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS

M.	DARMON David	Médecine Générale (53.03)

PROFESSEURS AGRÉGÉS

Mme	LANDI Rebecca	Anglais

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M.	BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
M.	BRONSARD Nicolas	Anatomie Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (42.01)
Mme	BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M	DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M	FAVRE Guillaume	Néphrologie (52.03)
M.	FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M.	GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme	GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
Mme	HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
M.	HUMBERT Olivier	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	LAMY Brigitte	Bactérilogie-virologie (45.01)
Mme	LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme	LONG-MIRA Elodie	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
Mme	SEITZ-POLSKI barbara	Immunologie (47.03)
M.	TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Université Nice Sophia Antipolis

Faculté de Médecine

Liste des professeurs au 1er septembre 2017 à la Faculté de Médecine de Nice

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

M.	DURAND Matthieu	Urologie (52.04)
M.	ILIE Marius	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M.	GARDON Gilles	Médecine Générale (53.03)
Mme	HURST Samia	Thérapeutique (48.04)
M.	PAPA Michel	Médecine Générale (53.03)

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

M	BALDIN Jean-Luc	Médecine Générale (53.03)
Mme	CASTA Céline	Médecine Générale (53.03)
M.	HOGU Nicolas	Médecine Générale (53.03)
Mme	MONNIER Brigitte	Médecine Générale (53.03)

PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ

M.	BERTRAND François	Médecine Interne
M.	BROCKER Patrice	Médecine Interne Option Gériatrie
M.	CHEVALLIER Daniel	Urologie
Mme	FOURNIER-MEHOUAS Manuella	Médecine Physique et Réadaptation
M.	JAMBOU Patrick	Coordination prélèvements d'organes
M.	ODIN Guillaume	Chirurgie maxilo-faciale
M.	PEYRADE Frédéric	Onco-Hématologie
M.	PICCARD Bertrand	Psychiatrie
M.	QUARANTA Jean-François	Santé Publique

AVANT PROPOS ET REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury :

A Monsieur le **Professeur Paul HOFMAN**
Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Votre dynamisme, votre vision avant-gardiste de la spécialité, votre implication, vos compétences, sont autant de motivations pour progresser chaque jour.
Soyez assuré de toute mon admiration et de mon profond respect.

A Monsieur le **Professeur Jean Philippe LACOUR**
Je vous remercie pour votre accueil et votre enseignement lors de mes 2 semestres dans votre service de dermatologie. Votre rigueur et votre savoir forcent le respect.
Vous me faites l'honneur de juger cette thèse, soyez assuré de ma reconnaissance.

A Monsieur le **Professeur Thierry PASSERON**
J'ai grandement apprécié votre disponibilité, votre enseignement pédagogique et votre bonne humeur permanente pendant mes 2 semestres en dermatologie.
Je suis très honorée que vous ayez accepté de juger ce travail de thèse.

A Monsieur le **Docteur Emmanuel CHAMOREY**
Je vous remercie de m'avoir aidée pour l'analyse statistique de ce travail. Votre disponibilité, votre patience et vos conseils avisés ont été pour moi d'une aide immense. Je suis heureuse que vous ayez accepté de faire partie de ce jury.

A Monsieur le **Docteur Jean-François ROUSSEL**
Merci pour ta patience, ta disponibilité et ta sympathie. J'ai beaucoup appris à tes côtés lors de mon semestre dans le laboratoire de Pathologie du Centre Hospitalier Princesse Grace.
Je te remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Sois assuré de mon estime et de ma gratitude.

A Monsieur le **Docteur Ioannis LIOLIOS**
Je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail et de nous faire partager ton expertise en dermatopathologie.

A Madame le **Docteur Véronique HOFMAN**
Je te suis très reconnaissante d'avoir dirigé cette thèse avec bienveillance. Ton aide et tes conseils ont été précieux. Je te remercie pour ton infinie patience, ta disponibilité, ta bonne humeur et ta gentillesse. Tu as grandement participé à ma formation durant mon internat et j'espère pouvoir continuer à me former à tes côtés.

Aux médecins, ingénieurs et techniciens qui ont contribué à ce travail :
A **Jean-Marc**, pour ton soutien, ta gentillesse et ta disponibilité. Et **A Christelle**, pour m'avoir guidé dans mes premiers pas en analyse statistique. Merci à tous les 2 pour votre accueil dans votre bureau pendant ces 2 semestres, j'en garde un très bon souvenir.
A **Marine et Marame**, pour votre aide pour le déstockage, la coupe et la réalisation des IHC, en un temps record !
Au **laboratoire de Pathologie DIAG** (et notamment au **Docteur Nicolas Rouyer**, **Tatiana, Nisrine** et **Franck)** pour avoir contribué à ce travail et pour votre accueil si sympathique à chaque fois que je suis venue dans votre Laboratoire.
Au **laboratoire de Pathologie MEDIPATH** et notamment au **Docteur Anne Flore Albertini**, pour avoir contribué à ce travail.
Au **laboratoire de Pathologie CAP** et notamment au **Docteur Patricia Maccario** pour avoir contribué à ce travail.
A **Renaud**, pour ton efficacité et ton aide précieuse pour l'analyse statistique.

Aux médecins qui ont participé à ma formation

Au **Docteur Cathy Butori**, pour votre disponibilité, votre enseignement et votre partage des connaissances, toujours avec beaucoup d'enthousiasme et de gentillesse.
Aux **Docteurs Sandra Lassalle et Elodie Long**, pour votre sympathie, vos conseils et votre soutien pendant ce dernier semestre d'internat. J'espère continuer à apprendre beaucoup à vos côtés.
Au **Docteur Marius Ilié**, pour ta disponibilité et ta rigueur, merci d'avoir toujours répondu présent.

Au **Docteur Florence Dupré**, pour votre accueil chaleureux lors de mon semestre dans votre service dans le laboratoire de Pathologie du CHPG. Ce semestre a été essentiel dans ma formation. Soyez assurée de ma reconnaissance.
Au **Docteur Claire Mainguené**, pour ton sourire, ta sympathie et ta bienveillance. Sois assurée de ma gratitude.
Aux **Docteurs Hélène Duval, Isabelle Monticelli, Nathalie Clément et Florence Ragage**, pour votre sympathie. Merci pour ce semestre enrichissant !

A Monsieur le **Professeur Jean-François Michiels**, je vous remercie pour votre disponibilité et votre enseignement toujours dispensé avec enthousiame, j'ai beaucoup appris dans votre service. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.
Au **Docteur Marie-Christine Saint Paul**, pour votre enseignement en pathologie digestive et les heures passées au multi-tête.
Au **Docteur Nathalie Cardot et Christophe Perrin**, pour votre enseignement en dermatopathologie.
Au **Docteur Damien Ambrosetti**, pour ta disponibilité, tes conseils et ton enseignement.
Aux **Docteurs Fanny Vandenbos, Anne Chevallier, Marjorie Piche** et **Agnès Rampal**
Au **Docteur Michael Coutts**, pour ton amitié et ta pédagogie lors de ton enseignement en gynécopathologie au cours de mon premier semestre d'internat. Je te dois beaucoup.
A **Sophie**, merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ta grande disponibilité : ta porte est toujours ouverte. J'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés et je n'oublierai pas ta formation et ton raisonnement en dermatopathologie. Merci !

A **Maxime**, pour ton sourire et ta sympathie lors des séances lymphomes.
A **Zoé**, **Bérangère** et **Stéphanie**.

Aux **Docteurs Anne Sudaka, Isabelle Peyrottes, Juliette Haudebourg** et **Myriam Marcy** pour m'avoir accueillie dans votre service et pour votre enseignement enrichissant en pathologie mammaire.

A **mes co-internes** : Matthieu, Youta, Julien, Laetitia, Mélanie, Lydie

Au service de dermatologie du CHU de Nice, de l'hospitalisation à la consultation en passant par le centre laser avec une pensée particulière pour **Audrey, Isabelle, Nathalie** et **Céline**.

A l'ensemble des techniciens secrétaires, ASH, ingénieurs et cadre du LPCE pour votre gentillesse, votre disponibilité, vos compétences et votre soutien pendant ce dernier semestre d'internat pendant lequel je préparais ma thèse. **Judith, Olivier C, Pascal, Cyrielle, Yvonne, Marine, Marame, Salomé, Katia, Julien, Virginie T, Virginie L, Camille, Lydia, Priscilla, Olivier B, Eric, Anthony, Sylvain, Maryline, Kevin, Jean-Marc, Christelle, Ludivine, Nathalie** et **Isabelle** : Une belle équipe avec laquelle il est très agréable de travailler !

A l'ensemble des techniciens, secrétaires, ASH et cadre du laboratoire de Pathologie du CHPG à Monaco pour votre accueil chaleureux. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés.

A l'ensemble des techniciens, secrétaires, ASH, ingénieurs et cadre du CAL et du LCAP pour votre accueil et votre professionnalisme.

A ma Famille

A **mes parents,** à qui je dois tant. Si je suis arrivée là aujourd'hui c'est grâce à vous, à votre Amour, à votre éducation, à votre soutien et à notre famille Unie. Maman, merci pour le dévouement et tout le soutien que tu m'as apporté pendant ma 1ère année de médecine. Notre complicité est éternelle. Vous êtes mon modèle. Avec tout mon amour, Merci !

A **Rémi**, mon soutien de tous les instants ! Tu as eu le courage de subir 2 concours d'internat, 2 internats et 2 thèses ! Merci pour tout l'Amour et le bonheur que tu m'apportes depuis notre rencontre. Je t'aime.

A **mon petit frère Christopher** : je garde en tête tous ces bons moments de complicité qu'on a passé ensemble pendant notre enfance. J'espère qu'on continuera à se voir le plus souvent possible et qu'on partagera toute notre vie plein de belles choses ensemble.

A **Mamie Véro** : Ton sourire, ton courage, ta gentillesse, ton Amour sont les piliers de ma vie. Je n'oublierai jamais tous ces souvenirs de mon enfance à la Colle. Tu es merveilleuse !

A **mon Papy Celo**: de là haut, tu me vois surement et j'espère que tu es fier de moi, j'aurai tellement aimé que tu sois là. Tu me manques, je t'aime.

A **Mamie Alice et Papy Robert** : j'aurai tellement aimé que vous soyez là, je pense très fort à vous, vous me manquez.

Au **reste de ma famille**, Yves et Marie-France, Julien, Julia, Charles et Marion, François, Aurélie, Antoine et Maxime, Brigitte et Gérard, Gaelle, Marine, Stéphane, Clara et Valentin, Aymeric, Anne-Sophie, Octave et Valentine.

A **ma Marraine Elisabeth**, je ne te remercierai jamais assez pour toute l'affection que tu m'apportes depuis mon enfance. J'ai vraiment de la chance d'avoir une marraine comme toi !

A **ma belle famille**: **Chantal, Pierre, Mylène, Timothée** et **Michael, Bernadette** et **Emilienne**, merci pour votre gentillesse, votre soutien et votre accueil si chaleureux.

A mes Amis

A **Alex**, même si les kilomètres nous séparent, rien ne change, on se connaît par cœur. Mais je rêve quand même que tu reviennes à Nice ! Notre amitié est éternelle. Merci d'être là.

A **Justine**, pour ces inoubliables souvenirs et cette complicité qui nous unit depuis de si nombreuses années. Rentre vite à Monaco avec André pour qu'on continue de partager plein d'autres bons moments !

A **Zahra, Véronique, Gerd** et **Daniel** pour votre affection depuis toutes ces années.

A **Cécile**, ma plus « vieille » amie, avec le plus grand cœur. Je sais que je pourrai toujours compter sur toi, Merci !

A **Pierre, Alexia et mon petit Clément** : Notre amitié m'est très chère. Merci pour votre présence, vos sourires, votre gentillesse et votre soutien !

A **mes amis isoliens** : **Isa et Ju**, **Mika et Nanou**, **Bastien**, merci pour votre présence !

A **Alex Marsaud**, une amitié sincère, quelqu'un sur qui on peut toujours compter. Je n'oublierai jamais ton soutien lors de ma D4 ! J'espère qu'on continuera à partager de nombreux bons moments ensemble !

A **Christelle,** une amie fidèle qui répond toujours présente. Merci pour ta gentillesse, ton dynamisme et félicitations pour ton nouveau bonheur !

A **Michelle et Yoyo**, je suis heureuse de vous savoir de retour à Nice !

A **toute la bande** : les **Bugnas**, les **Gastaud**, les **Le Bourdon**, **Romain et Joy**, **Alex et Fred**, **Céline et Jeff**, **Seb**. C'est grâce à Rémi que je vous ai rencontré et aujourd'hui notre amitié m'est très chère. A **Coraline et Arnaud**, les plus gentils! A notre amitié naissante !

Et à tous ceux que j'oublie…

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS & REMERCIEMENTS
LISTE DES PROFESSEURS DE LA FACULTE DE MEDECINE DE NICE
SOMMAIRE ……..…1
INTRODUCTION ……..…. .2
PATIENTS ET METHODES ……...4
RESULTATS ……8
DISCUSSION ……. 12
PERSPECTIVES D'ETUDES …….19
TABLEAUX ET FIGURES …….. 22
ANNEXES ……..…… 29
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES …… 32
SERMENT HIPPOCRATE …… 35

INTRODUCTION

Le mélanome est l'un des cancers dont l'incidence et la mortalité ont significativement augmenté ces dernières décennies. En France, en 2015, 14 325 nouveaux cas de mélanomes cutanés ont été diagnostiqués, responsables du décès de 1 773 patients(1). Selon les dernières données GLOBOCAN, 232 000 nouveaux cas de mélanomes ont été diagnostiqués et plus de 55 000 personnes sont décédées d'un mélanome au stade avancée en 2012 dans le monde (2). Le pronostic des mélanomes cutanés avec des métastases à distance (stade IV) est très péjoratif avec une survie relative à 5 ans inférieure à 20% (3).

L'avènement de l'immunothérapie, en particulier des inhibiteurs des « points de contrôle » (checkpoint inhibitors) du système immunitaire ciblant l'axe PD-1 (Programmed Death-1) / PD-L1 (Programmed Death Ligand-1), a considérablement modifié la prise en charge et amélioré le pronostic de certains patients atteints d'un mélanome à un stade métastatique, avec des taux de réponse et de survie parfois élevés (4) (5) (6). C'est dans ce contexte, que deux molécules anti-PD-1 (nivolumab, Opdivo, Bristol-Myers Squibb, et pembrolizumab, Keytruda, Merck) ont récemment reçu l'approbation de la US FDA (United States Food and Drug Administration) comme traitement de 1ère ligne ou après traitement par un inhibiteur de BRAF dans cette indication.

Suite à la première étude de phase I publiée en 2012 évaluant le nivolumab (5), de nombreux essais thérapeutiques ont été associés à l'analyse de l'expression immunohistochimique (IHC) de PD-L1 comme biomarqueur prédictif de la réponse aux traitements anti PD-1 et PD-L1. Cette expression par les cellules tumorales était prédictive d'une bonne réponse à l'immunothérapie, mais néanmoins un bénéfice clinique important était également observé chez les patients dont la tumeur n'exprimait pas PD-L1 (7) (8).

De façon peu expliquée à ce jour, le bénéfice de ces traitements est restreint à une sous population de patients, puisque 40% des patients ne répondent pas aux anti-PD-1 en monothérapie. Ainsi dans la plupart des essais cliniques, la valeur prédictive de l'IHC PD-L1 ne permet pas seule de sélectionner de façon optimale les patients répondeurs (4). Ce biomarqueur apparait aujourd'hui insuffisant pour être prédictif d'une réponse thérapeutique aux anti-PD-1/PD-L1 chez les patients atteints de mélanomes métastatiques, ouvrant ainsi la voie à d'autres recherches visant à optimiser les tests prédictifs par la découverte d'autres biomarqueurs associés.

La valeur pronostique de l'expression de PD-L1 chez les patients ayant un mélanome métastatique est très controversée, associée à un mauvais ou à un bon pronostic selon les études (9) (10) (11) (12). Ainsi, PD-L1 n'apparait pas comme étant un biomarqueur pronostique utilisable en pratique quotidienne.

Si ce biomarqueur, utilisé seul, est aujourd'hui insuffisant, tant sur le plan pronostique que théranostique, particulièrement dans le cas du mélanome, d'autres biomarqueurs sont actuellement en train d'émerger afin d'optimiser la prise en charge des patients à l'ère de l'immunothérapie.

La présence d'un infiltrat lymphocytaire T CD8+ intra tumoral ($CD8^{+}TIL$) pourrait ainsi être l'un des marqueurs pronostique et prédictif important à intégrer, notamment en association avec l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales.
Certaines études ont montré l'importance du micro environnement dont les lymphocytes intratumoraux CD8+ ($CD8^{+}TIL$) et la corrélation possible avec une bonne réponse aux thérapies anti PD-1 pour certaines tumeurs solides (13) (8) (14).

Une classification des tumeurs en 4 groupes, basée sur la présence ou l'absence de $CD8^{+}TIL$ et l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales a ainsi été récemment proposée afin de prédire la réponse à l'immunothérapie. Ces études restent limitées actuellement dans le mélanome (15) (16).

L'objectif de notre étude a été de corréler l'expression de PD-L1, combinée à la présence ou non de $CD8^{+}TIL$, à la survie globale et à la réponse à l'immunothérapie dans le but de déterminer si cette association pouvait être un biomarqueur pronostique et prédictif plus performant que l'IHC PD-L1 seule.

Nous avons pour cela analysé en IHC l'expression de PD-L1 et des $CD8^{+}TIL$ sur 105 mélanomes cutanés primitifs, ainsi que sur leurs métastases et évalué l'impact des différentes associations sur la survie globale et sur la réponse thérapeutique.

PATIENTS ET METHODES

PATIENTS

Cette étude rétrospective a été réalisée au sein du Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale (LPCE, Hôpital Pasteur I, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France) à partir d'une cohorte de 105 patients présentant un mélanome malin cutané primitif d'évolution métastatique (stades III/IV) diagnostiqué entre juillet 2003 et février 2017 et hospitalisés dans le service de dermatologie (Hôpital de l'Archet II, Centre Hospitalier Universitaire, de Nice, France). Les échantillons tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine provenaient du LPCE, du Laboratoire DIAG (Nice, France), du Laboratoire MEDIPATH (Mougins, France), et du Laboratoire CAP (Nice, France).

Deux cent deux patients atteints de mélanomes métastatiques ont été initialement enregistrés pour cette étude. Quatre-vingt dix sept patients [(97/202), 48%] ont été exclus en raison de l'impossibilité d'apparier les prélèvements de mélanomes primitifs avec au moins une métastase (prélèvements de mélanomes primitifs non disponibles, matériel tissulaire épuisé ou trop exigu, mélanomes régressifs, localisations primitives extra cutanées).

Parmi ces patients, 105 ont été sélectionnés avec deux prélèvements au moins analysés par patient : la lésion tumorale primitive et au moins une lésion métastatique.

Nous disposions pour certains patients de plusieurs métastases. Un seul prélèvement métastatique d'un même site et de la même année a été conservé pour l'étude, représentant un total de 144 métastases appariées aux tumeurs primitives des 105 patients. L'analyse IHC des métastases a porté dans 70% des cas (74/105) sur une seule métastase, dans 22% des cas (23/105) sur deux métastases et dans 8% des cas (8/105) sur trois métastases.

Il s'agissait essentiellement de sites métastatiques sous cutanés régionaux (n=54) et ganglionnaires régionaux (n=68), et plus rarement de métastases à distance [pulmonaires (n=11), sous cutanées (n=8), colique (n=1) et sphère oro-pharyngé (n=2)].

Les 105 premiers évènements métastatiques documentés histologiquement (et appariés aux 105 mélanomes primitifs) étaient ceux étudiés dans ce travail et correspondaient à 91 métastases régionales (35 sous cutanées et 56 métastases ganglionnaires) et à 14 métastases à distance (8 métastases pulmonaires et 6 métastases sous cutanées).

L'ensemble des données cliniques et évolutives des patients, ainsi que leurs traitements ont été recueillis dans le dossier médical informatisé du CHU de Nice.

Deux sous populations de patients ont été distinguées pour cette étude ; un groupe de patients traité par immunothérapie (anti PD-1 et/ou anti-CTLA4) représenté par 51 patients [(51/105), 48,5%] ayant reçu au moins un traitement d'immunothérapie et un groupe de patients non traité par immunothérapie représenté par 54 patients [(54/105), 51,5%] n'ayant eu aucun traitement ou ayant eu des traitements autres qu'une immunothérapie (thérapies ciblées anti-BRAF et/ou anti-MEK ou chimiothérapies). Parmi les 51 patients du groupe traité par immunothérapie, 29 [(29/51) 57%] ont bénéficié d'une immunothérapie exclusive et 22 [(22/51) 43%] ont eu une immunothérapie avant ou après avoir eu d'autres traitements (chimiothérapies ou thérapie ciblées).

Tous les patients ont donné leur consentement écrit afin que leurs prélèvements puissent être utilisés à des fins de recherche clinique (autorisation d'étude selon la réglementation de la biobanque du CHU de Nice, BB-0033-00025, Nice, Fr).

METHODES

Analyse histologique

Tous les prélèvements tissulaires ont été fixés dans du formol tamponné à 10% puis inclus en paraffine. Une lame d'hématoxyline éosine safran (HES) a été réalisée sur chaque bloc (4µm). Toutes les lames d'HES ont été relues par 2 pathologistes (Coraline Bence et Véronique Hofman). Les données anatomopathologiques (sous-type histologique, épaisseur de Breslow, présence ou non d'une ulcération, stade pTNM) ont ainsi été recueillies. Les mélanomes primitifs ont été reclassés selon la 8ème édition AJCC 2016 (*American Joint Committee Cancer*) tumor, node, metastasis (TNM) classification.

La densité de l'infiltrat inflammatoire mononucléé [absent (0), léger (1+), modéré (2+), intense (3+)] ainsi que sa topographie ont été évaluées afin de déterminer la présence de lymphocytes infiltrant les mélanocytes tumoraux ou TIL. Il a été défini que les TIL étaient absents lorsqu'il n'avait pas été observé de lymphocytes dans la composante invasive du mélanome (au contact ou intra tumoral). Les lymphocytes situés en périphérie à distance de la tumeur, ou bien au sein de la fibrose tumorale ou en situation péri-vasculaire n'ont pas été retenus comme étant des TIL.

Analyse immunohistochimique (IHC)

L'analyse IHC du marqueur PD-L1 a été réalisée avec l'anticorps monoclonal de lapin anti PD-L1 (clone 28.8 Kit PD-L1 PharmDx, Dako) sur un automate Autostainer Link 48 Dako, à partir de coupes de 4µm d'épaisseur sur des lames Superfrost Plus, séchées en étuve à 58°C pendant 25mn. Le protocole d'immunomarquage a été réalisé en deux étapes: une phase de prétraitement (PT Link Dako et solution EnVision FLEX Target Retrieval low PH) pendant 53 minutes, puis une phase d'incubation avec l'anticorps PD-L1 pendant 30 minutes et le reste des composants du kit PD-L1 28-8 pharmDx, suivi d'un lavage (Wash Buffer EnVision FLEX) et d'une contre-coloration de 7 minutes avec l'hématoxyline (EnVision FLEX). Un contrôle positif et négatif a été réalisé sur chaque série d'IHC à partir de lames de contrôle fournies dans le kit.

L'évaluation de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales a été réalisée indépendamment par les 2 pathologistes (Coraline Bence et Véronique Hofman). En cas de discordance entre les 2 pathologistes, les lames ont été revues au microscope multitête avec un troisième pathologiste (Marius Ilié) afin d'obtenir un consensus. La positivité de PD-L1 a été définie comme l'expression d'un marquage membranaire, partiel ou complet, dans au moins 5% des cellules tumorales, quelque soit l'intensité et ceci dans une section tissulaire contenant au moins 100 cellules tumorales analysables (17) (18) (19) (20).

L'analyse IHC du marqueur CD8 a été réalisée sur l'automate BenchMark ULTRA (Roche, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin anti-CD8 (clone SP57, Ventana). Le compte des CD8 a été fait en estimant le pourcentage de lymphocytes CD8 marqués, par rapport à la totalité de l'infiltrat inflammatoire mononucléé.

Deux catégories d'infiltrat inflammatoire ont été définies en fonction de son intensité, de la présence ou l'absence de TIL et de l'expression du CD8 sur les lymphocytes ; le groupe $CD8^{+}$TIL positif se caractérisait par un infiltrat inflammatoire mononucléé d'intensité modéré (2+) ou intense (3+) et infiltrant la tumeur (présence de TIL) avec un seuil d'expression minimum à 10% pour CD8. Le groupe $CD8^{+}$TIL négatif comprenait de façon arbitraire tous les autres cas, soit un infiltrat inflammatoire absent (0) ou léger (1+) ou n'infiltrant pas la tumeur (absence de TIL) ou bien avec moins de 10% de lymphocytes CD8 marqués.

Les tumeurs primitives et les 105 premières métastases ont été ensuite classées en 4 groupes sur la base de leur statut IHC PD-L1 et sur la présence ou l'absence de $CD8^+$TIL: 1) $CD8^+$TIL+/PD-L1+, 2) $CD8^+$TIL-/PD-L1-, 3) $CD8^+$TIL+/PD-L1- et 4) $CD8^+$TIL-/PD-L1+.

Mutation du gène BRAF

L'extraction d'ADN a été réalisée avec le kit QiAmp DNA FFPE Tissue Kit (Quiagen Hilden, Allemagne) et la recherche de mutation du gène *BRAF* par pyroséquençage comme précédemment décrit en utilisant le kit therascreen BRAF Pyro24 (Qiagen) sur l'ensemble des 105 patients à partir d'un des prélèvements métastatiques(21).

Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au risque alpha=5% en hypothèse bilatérale à l'aide du logiciel R.3.2.3 sous Windows. Les données qualitatives ont été présentées sous forme de fréquences absolues, pourcentages, intervalles de confiance à 95%, pourcentages de données manquantes. Ces données ont été comparées à l'aide du test du Chi2 ou du test de Fisher en cas de non-respect des conditions d'application du Chi2. Les données quantitatives ont été décrites par les médianes, extrêmes, moyennes, écart-types et pourcentages de données manquantes. Ces données ont été comparées à l'aide du test T de Student ou du test de Mann-Withney en cas de non-respect des conditions d'application du test de Student. La survie globale depuis le primitif était définie par le délai entre la date du diagnostic de la tumeur primitive et la date du décès du patient ou la date des dernières nouvelles. La survie globale depuis la première métastase était définie par le délai entre la date du diagnostic de la première métastase et la date du décès du patient ou la date des dernières nouvelles. Les patients perdus de vue ayant été censurés à la date du dernier contact. Ces données ont été décrites par les taux de survie, les médianes de survie et les intervalles de confiance à 95%. Les courbes de survie ont été comparées par le test de Log-Rank. Des analyses multivariées ont été réalisées à l'aide de modèles de régression de Cox avec calcul des Hazard ratio ajustés correspondant. Pour toute l'étude, le suivi maximum des patients a été limité à 60 mois.

RESULTATS

Caractéristiques cliniques et histo-moléculaires des 105 mélanomes primitifs cutanés

Les principales caractéristiques cliniques, histologiques (sous type histologique, ulcération, pTNM) et moléculaires (analyse du gène *BRAF*) des 105 mélanomes primitifs cutanés sont détaillées dans le **tableau 1**. Les sous types histologiques SSM (mélanome superficiel extensif) et nodulaires étaient majoritaires et les mélanomes ulcérés représentaient 51,4% des cas. Le stade pTNM rapporté dans le tableau 1 a été évalué lors du diagnostic initial du mélanome primitif. Les stades I et II représentaient 20,0% et 64,7% des cas, respectivement. Toutes ces données sont également décrites dans les deux sous-groupes de patients : 51 patients ayant reçu un traitement par immunothérapie et 54 n'ayant jamais été traités par immunothérapie. Il n'a pas été observé de différence significative pour l'ensemble de ces données au sein des deux groupes de patients recevant ou pas un traitement par immunothérapie, hormis pour l'âge : les patients traités par immunothérapie étant légèrement plus jeunes que les patients ne recevant pas d'immunothérapie [60 ans versus 66ans, (p 0,031)].

Expression de PD-L1, statut CD8$^+$TIL et analyse des groupes CD8$^+$TIL/PD-L1 au sein des 105 mélanomes primitifs et 105 premières métastases de chaque mélanome (tableau 2)

La positivité du marquage PD-L1 sur les cellules tumorales (seuil ≥ 5%) était observée dans 33,3% (35/105) des mélanomes primitifs (50 % de cellules tumorales marquées étant le maximum observé) et dans 39,0% (41/105) des premières métastases de chaque mélanome (100% de cellules tumorales marquées étant le maximum observé). L'expression de PD-L1 était membranaire, essentiellement hétérogène et focale, le plus souvent en périphérie de la tumeur, au niveau du front d'invasion tumoral. **(Figure 1).**

Les cellules mononuclées du microenvironnement infiltrant la tumeur étaient des lymphocytes mais aussi parfois des plasmocytes ou des macrophages. Cet infiltrat était le plus souvent situé en périphérie en bordure des massifs tumoraux, formant des agrégats, et/ou plus rarement intra tumoral sous forme de cellules isolées. La topographie et la densité de cet infiltrat étaient bien visibles sur le marquage IHC CD8 **(Figure 2).**

Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) présentaient tous au minimum un contingent de 10% de lymphocytes T CD8+, appelés dans notre étude, les CD8$^+$TIL positifs.

Parmi les mélanomes primitifs, les infiltrats inflammatoires $CD8^+$TIL positifs étaient prédominants [(64/105) 60,9%]. La classification en 4 groupes sur la base du statut PD-L1 et sur la présence ou l'absence de $CD8^+$TIL a montré que les groupes $CD8^+$TIL+/PD-L1- et $CD8^+$TIL-/PD-L1- étaient les plus représentés, suivi du groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1+ alors que le groupe $CD8^+$TIL-/PD-L1+ était peu représenté **(Figure 3).**

Au sein des métastases, le statut $CD8^+$TIL positif était observé dans 46,6% (49/105) des cas et la répartition des groupes montrait une prédominance du groupe $CD8^+$TIL-/PD-L1- suivi du groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1+ et une nette diminution du groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1-. Le groupe $CD8^+$TIL-/PD-L1+ restait peu représenté.

Analyse de la survie globale selon l'expression de PD-L1, le statut $CD8^+$TIL et le statut associé $CD8^+$TIL/ PD-L1 analysés au sein des 105 mélanomes primitifs

Le stade pTNM et la présence ou non d'une ulcération, étaient des facteurs pronostiques significatifs de la survie globale dans notre population (p=0,044 et p=0,00068, respectivement). A l'inverse, l'expression de PD-L1 et le statut $CD8^+$TIL analysés de manière indépendante n'étaient pas des facteurs pronostiques significatifs (p=0,50 et p=0,27, respectivement).

L'analyse de la survie globale selon le statut $CD8^+$TIL/PD-L1 précédemment décrit montrait que la présence de $CD8^+$TIL associée à la non expression de PD-L1 sur les cellules tumorales (groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1-) tendait à être associée à une meilleure survie [72% de patients en vie à 60 mois (26/36)] comparativement aux autres groupes, notamment $CD8^+$TIL+ /PD-L1+ [50% de patients en vie à 60 mois (14/28)], mais ces résultats étaient non significatifs (p=0,18) **[Figure 4(a), annexe 1].**

Le groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1- comparé aux 3 autres groupes analysés ensemble, avait un bon pronostic, avec une meilleure survie globale (p=0,04). Le pourcentage de patients en vie à 60 mois était de 72% (26/36) pour le groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1- versus 50% (35/69) pour l'ensemble des patients des 3 autres groupes réunis [**Figure 4(b), annexe 1)**]

L'analyse multivariée, prenant en compte l'âge, le type histologique, la présence d'une ulcération et le stade pTNM, montrait que le statut immunohistochimique $CD8^+$TIL+/PD-L1- était un facteur pronostique significatif et indépendant avec une meilleure survie globale (hazard ratio (HR) : 0,41; intervalle de confiance IC à 95% (IC95%) [0,17-0,98]; p=0,04).

Analyse de la survie globale selon l'expression de PD-L1, le statut CD8$^+$TIL et le statut associé CD8$^+$TIL/ PD-L1 analysés au sein des 54 mélanomes primitifs non traités par immunothérapie

Au sein de la population des patients n'ayant jamais reçu de traitement par immunothérapie, l'expression de PD-L1 et le statut CD8$^+$TIL analysés de manière isolée n'étaient pas des facteurs pronostiques significatifs (p=0,11 et p=0,61, respectivement).

L'analyse de la survie globale selon le statut CD8$^+$TIL/PD-L1 montrait une différence significative entre les 4 groupes (p=0,015) **[Figure 5(a), annexe 2)]**.

Le groupe CD8$^+$TIL+/PD-L1- isolé des 3 autres groupes était un facteur de bon pronostic (p=0,009), associé à une meilleure survie globale avec un pourcentage de patients en vie à 60 mois de 83% (15/18) versus 47% pour les 3 autres groupes réunis (17/36) **(Figure 5(b), annexe 2).** Ces résultats étaient confirmés en analyse multivariée qui montrait que le statut CD8$^+$TIL+/PDL1- était un facteur de bon pronostic, indépendant (HR : 0,05; IC95% [0,007-0,36]; p=0,002).

D'autre part, dans cette population de patients, nous avons observé que le statut CD8$^+$TIL+/PD-L1+, isolé des 3 autres groupes, était un facteur de mauvais pronostic (p=0,014). Le pourcentage de patients en vie à 60 mois était de 37% (6/16) versus 68% pour les trois groupes associés (26/38) **(Figure 5(c), annexe 2)**. Le statut CD8$^+$TIL+/PD-L1+ était confirmé comme étant un facteur de mauvais pronostic significatif et indépendant associé à une mauvaise survie globale, en analyse multivariée (HR : 6,7; IC95% [1,63-27,93]; p=0.007).

Analyse de la survie globale selon l'expression de PD-L1, le statut CD8$^+$TIL et le statut associé CD8$^+$TIL/ PD-L1 analysés au sein des 51 mélanomes primitifs traités par immunothérapie

Dans la population de patients traitée par immunothérapie, l'expression de PD-L1 et le statut CD8$^+$TIL analysés de manière isolée n'étaient pas des facteurs pronostiques ou prédictifs significatifs de la réponse à l'immunothérapie (p=0,50 et p=0,30, respectivement).

Il n'existait pas de différence significative de la survie globale lorsqu'on analyse les 4 groupes CD8$^+$TIL/PD-L1 pris isolément (p=0,63).

Le statut CD8$^+$TIL+/PD-L1- isolé des 3 autres groupes n'était pas un facteur pronostique significatif de la survie (p=0,86).

Par contre, le groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1+ tendait à avoir une meilleure survie globale avec un pourcentage de patients en vie à 60 mois augmenté par rapport aux 3 autres [66% (8/12) de patients en vie versus 53% (21/39)], sans que ce résultat soit significatif en analyse univariée (p=0,34) (**Figure 5(d), annexe 3).**

En analyse multivariée, le statut $CD8^+$TIL+/PD-L1+ était un facteur prédictif, significatif et indépendant, d'une bonne réponse à l'immunothérapie et d'une meilleure survie par rapport aux autres groupes (p=0,022).

Analyse de la survie globale selon l'expression de PD-L1, le statut $CD8^+$TIL et le statut associé $CD8^+$TIL/ PD-L1 analysés au sein des 105 premières métastases

Les analyses statistiques univariées sur la survie globale précédemment décrites pour les 105 mélanomes primitifs, ont été réalisées également sur les premières métastases des 105 patients (quelque soit le site métastatique). Il n'existait pas de résultats significatifs. L'expression de PD-L1, les statuts $CD8^+$TIL et $CD8^+$TIL/PD-L1, n'étaient pas significativement liés à la survie (données non montrées).

Corrélation de l'expression de PD-L1 sur les 105 primitifs avec le statut mutationnel BRAF

Il n'a pas été observé de corrélation significative entre l'expression de PD-L1 et le statut mutationnel BRAF.

DISCUSSION

Le mélanome est l'un des cancers présentant les taux de mutations somatiques les plus élevés parmi les tumeurs malignes (22), ce qui explique en partie leur immunogénicité élevée, c'est à dire leur capacité d'induire une réponse immunitaire adaptative dirigée spécifiquement contre les antigènes tumoraux.

A l'état physiologique, le checkpoint de l'immunité PD-1/PD-L1 est un mécanisme permettant de limiter les réactions immunes exacerbées, comme les phénomènes auto-immuns, PD-1 appartenant au groupe des molécules d'inhibition de la réponse immune, comme CTLA4.
Les tumeurs développent de multiples stratégies pour échapper au système immunitaire. Ainsi, PD-L1 exprimé à la surface des cellules tumorales, lié à son récepteur PD-1 sur les lymphocytes T, en bloquant l'action des lymphocytes T cytotoxiques, constitue un mécanisme de résistance par lequel les tumeurs peuvent échapper à la réponse immunitaire adaptative (23). L'immunothérapie permet alors de restaurer l'immunité anti tumorale en bloquant ce mécanisme de résistance et cette interaction PD-1/PD-L1 (14).

Les mécanismes régulateurs de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ont été identifiés et peuvent coexister : i) <u>un mécanisme intrinsèque, constitutif</u>, secondaire à des évènements oncogéniques intracellulaires comme l'activation de voies de signalisation, les altérations chromosomiques ou l'amplification de gènes, mécanisme de résistance mis en place directement par les cellules tumorales et généralement associé à un mauvais pronostic, ii) <u>un mécanisme adaptatif</u>, induit par la présence de cellules immunitaires dans le micro environnement tumoral de type lymphocytes T $CD8^+$ et la sécrétion d'interféron gamma, correspondant également à un mécanisme de résistance mais aussi à un marqueur d'activation de l'immunité adaptative ; et enfin iii) un <u>mécanisme secondaire à l'hypoxie</u>.
Dans le mélanome, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est le plus souvent adaptative, plus rarement constitutive en rapport avec l'activation des voies des MAP Kinases (24) (8).
Cette expression adaptative s'illustre, dans notre étude comme dans la littérature, par une expression focale de PD-L1 dans les cellules tumorales, souvent en périphérie de la tumeur, au niveau du front d'invasion tumoral, et au contact d'un infiltrat inflammatoire $CD8^+$ (16).

L'évaluation du statut PD-L1 est actuellement difficile à apprécier en raison de l'hétérogénéité des méthodes d'études mais également en raison de l'hétérogénéité de son expression au sein de la même tumeur et selon le site tumoral, primitif ou métastatique. Dans le mélanome, les tests sur la plateforme d'IHC Dako avec deux clones d'anticorps différents, 28.8 et 22C3 ont été utilisés dans la majorité des essais cliniques sous forme de kit PharmDX (représentant aux USA des tests dits compagnon diagnostique) ; évaluant la valeur prédictive du test PD-L1, en association avec les molécules anti-PD1, le nivolumab et le pembrolizumab respectivement. Les seuils de positivité utilisés sont variables selon ces études, 1% ou 5% de cellules tumorales marquées, ainsi que la prise en compte ou non dans ce seuil de positivité des cellules immunitaires PD-L1 positives (25). Le seuil de positivité de 5% sur les cellules tumorales avec le clone 28.8 utilisé dans le kit PharmDx est le plus largement utilisé dans ces études cliniques (17) (18) (19) (20) (16) .

Il existe des discordances importantes de l'expression de PD-L1 au sein de la même tumeur (hétérogénéité intra tumorale) et entre des prélèvements de différents sites tumoraux chez les mêmes patients (hétérogénéité inter tumorale) (26).
Compte tenu de cette hétérogénéité intra tumorale et afin d'analyser la plus large zone tumorale, nous avons évalué l'expression de PD-L1 sur des coupes entières réalisées à partir de blocs de paraffine et non pas à partir de biopsies positionnées dans des tissue microarrays (TMAs). L'analyse sur coupe entière reflète mieux la distribution et le type de cellules exprimant PD-L1 et permet aussi d'évaluer la relation entre l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales et les cellules immunitaires.

En raison du mécanisme de résistance immunitaire adaptative et de l'existence de tumeurs immunogènes ou non, l'infiltration de cellules immunes dans la tumeur, en particulier les lymphocytes T, associée à l'expression de PD-L1 pourrait être un biomarqueur important d'efficacité des inhibiteurs du checkpoint PD-1/PD-L1.

Dans notre étude, le pourcentage de mélanomes primitifs exprimant PD-L1 sur les cellules tumorales était de 33 % et le plus souvent semblable à celui rapporté dans la littérature (16). Certaines études rapportent des pourcentages plus élevés : *Madore et al* a observé une positivité dans 51% des cas, mais avec un seuil de positivité à 1% (26). Une autre étude utilisant un seuil de 5%, rapporte 53% de tumeurs positives mais le site du prélèvement, primitif ou métastatique, n'était pas précisé dans l'étude (8).

La plupart des études qui se sont intéressées à la valeur prédictive de l'expression de PD-L1 pour la réponse aux thérapies anti PD-1/PD-L1 dans les mélanomes métastatiques n'ont pas distingué le site primitif ou métastatique (5) (14) (8). Il existerait des discordances entre l'expression PD-L1 dans les mélanomes primitifs et les sites métastatiques. Cette expression serait plus fréquemment retrouvée au sein des métastases, 43% versus 35% dans l'étude de *Taube et al*, ainsi que dans notre étude (39% versus 33%) mais des résultats contradictoires ont été rapportés par *Madore et al* (51% pour les primitifs, 57% pour les métastases régionales mais 42% pour les métastases à distance) (16) (26).

Nous n'avons pas mis en évidence d'association significative entre l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales des mélanomes primitifs et la survie globale, en accord avec l'étude de *Taube* (16). Ce biomarqueur, étudié isolément, n'est donc pas un facteur pronostique significatif pour ces deux études. Sa signification pronostique dans le mélanome est très controversée, parfois associée à un mauvais pronostic (9) (10) (11), ou inversement corrélée à un meilleur pronostic (12).

PD-L1 n'est pas un facteur prédictif significatif d'une réponse aux thérapies anti PD-1/PD-L1 dans notre cohorte de mélanomes primitifs. A l'inverse, de nombreuses études ont montré que l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales était prédictive d'une bonne réponse à l'immunothérapie. Néanmoins, un bénéfice clinique important, incluant en particulier des réponses durables, a également pu être observé dans la plupart des études au sein du groupe PD-L1 négatif, même si les taux de réponses restaient moins élevés (7) (8) (27). PD-L1 permettrait donc d'identifier les patients pouvant tirer un bénéfice plus important du traitement mais ne peut pas être à lui seul un test compagnon pour sélectionner les patients éligibles à l'immunothérapie. Ce type de test est donc un test diagnostique dit complémentaire. Au total, la variabilité des méthodes utilisées, l'absence de seuil de positivité standardisé, l'hétérogénéité spatio-temporelle du marquage et la présence d'une réponse à l'immunothérapie chez les patients PD-L1 négatifs font que PD-L1 ne parait pas être à lui seul un biomarqueur prédictif d'une éligibilité et d'une réponse à l'immunothérapie suffisant dans le cadre du mélanome.

La présence d'un infiltrat inflammatoire intra tumoral de type $CD8^+$TIL est fréquemment associé aux mélanomes (16) comme dans notre étude dans laquelle 60,9% des mélanomes primitifs présentaient un statut $CD8^+$TIL positif. Ce pourcentage est plus bas sur les prélèvements métastatiques analysés dans notre étude, tout site confondu (46,6%).
Nous n'avons pas mis en évidence d'association significative entre la présence de $CD8^+$TIL dans les mélanomes primitifs ainsi que dans les métastases et la survie globale, comme cela a été aussi observé dans la série de *Burton et al* (28). Toutefois, la plupart des études ont montré que la présence d'une densité importante de TIL dans les mélanomes primitifs était significativement associée à un meilleur pronostic (29) (30), données qui renforcent l'hypothèse d'un infiltrat lymphocytaire fonctionnel préalable indispensable à l'efficacité du blocage de l'axe PD-1/PD-L1.
Cependant, dans notre série, le statut $CD8^+$TIL, étudié isolément, n'était pas un facteur prédictif de la réponse significatif alors que *Tumeh et al* a précédemment montré qu'il pourrait constituer un marqueur plus fortement corrélé au bénéfice des anti-PD-1 que l'expression de PD-L1(14) (31).

L'évaluation des lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ infiltrant la tumeur ($CD8^+$TIL) dans le micro environnement tumoral est en fait difficile (15). Comme pour PD-L1, on observe dans la littérature une grande variation des méthodes d'évaluation des TIL (16) (26), parfois sans caractérisation immunophénotypique associée. L'absence de définition standardisée pour cette évaluation limite l'interprétation de ces résultats.

Toutefois, la présence d'un infiltrat lymphocytaire T $CD8^+$ ($CD8^+$TIL) dans la tumeur pourrait être un marqueur d'intérêt clinique très important lorsqu'il est associé à l'expression de PD-L1. Deux études ont suggéré que l'expression de PD-L1 devrait être interprétée en prenant en compte le microenvironnement tumoral. Les auteurs de ces études ont catégorisé les tumeurs en 4 différents types de microenvironnements tumoraux basés sur la présence ou l'absence de TIL et l'expression de PD-L1. (16) (15). Leurs résultats suggèrent que cette classification pourrait être prédictive de la réponse à l'immunothérapie.
L'association de la positivité de PD-L1 sur les cellules tumorales et d'un infiltrat inflammatoire de type $CD8^+$TIL (groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1+) était retrouvée dans 26,6% des mélanomes primitifs de notre étude, les groupes majoritaires étant les groupes $CD8^+$TIL-/PD-L1- et $CD8^+$TIL+/PD-L1-. L'expression de PD-L1 sans $CD8^+$TIL associés (groupe $CD8^+$TIL-/PD-L1+) était rare.

Ces observations étaient différentes sur les prélèvements métastatiques : le groupe $CD8^+$TIL-/PD-L1- devenait nettement majoritaire alors que le groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1- était deux fois moins représenté que dans les mélanomes primitifs. Il est intéressant de noter qu'on retrouvait approximativement la même répartition de ces différents groupes dans la série de *Taube et al* à la fois sur les mélanomes primitifs et métastatiques avec la même évolution des statuts (16). Il est rapporté dans une revue de la littérature, incluant les travaux de *Taube et al (2012)* une répartition différente montrant une prédominance des statuts $CD8^+$TIL+/PD-L1+ (38%) et $CD8^+$TIL-/PD-L1- (41%) mais sans distinction des mélanomes primitifs et métastatiques (15).

Nous avons pu observer dans notre étude sur les 105 mélanomes primitifs, que certains des 4 statuts $CD8^+$TIL/PD-L1 décrits ci-dessus, prenant en compte l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales et l'infiltrat $CD8^+$TIL, étaient à considérer comme des facteurs pronostiques ou théranostiques selon le groupe de patients étudié, population générale, patients traités ou non par immunothérapie.

Ainsi, le groupe de patient ayant un statut $CD8^+$TIL+/PD-L1- est un groupe avec un bon pronostic indépendant dans la population générale et de manière encore plus significative dans le groupe de patients non traité par immunothérapie (à 60 mois, respectivement 72% et 83% des patients en vie). A l'inverse, dans le groupe de patients traité par immunothérapie, ce profil n'était pas un facteur pronostique significatif sur la survie globale. Il semblerait que les patients dont les tumeurs sont $CD8^+$TIL+/PD-L1- ne soient pas des bons répondeurs à l'immunothérapie. En effet, dans notre cohorte, l'immunothérapie ne semble pas améliorer leur survie. Les stratégies thérapeutiques pour ce groupe de patients seraient potentiellement à réévaluer dans de nouvelles études. *Larkin et al* a montré l'intérêt des combinaisons d'immunothérapies (anti CTLA4 et anti PD-1) pour les tumeurs n'exprimant pas PD-L1 mais il n'a pas considéré la présence des $CD8^+$TIL associés (18).

Une des limites de notre étude est l'hétérogénéité de notre groupe des 51 patients traités par immunothérapie. Même si la majorité des patients a bénéficié d'une monothérapie de type anti PD-1, certains d'entre eux ont eu parfois 2 lignes d'immunothérapies différentes (anti CTLA4 puis anti- PD-1) et plus rarement d'autres types de traitements associés (chimiothérapies ou thérapie ciblées) au cours de la prise en charge de leur mélanome.

Nous avons montré également, que le statut $CD8^+$TIL+/PD-L1+ était un facteur de mauvais pronostic indépendant**,** significativement observé dans le groupe de patients non traités par immunothérapie, avec seulement 37% des patients en vie à 60 mois.
A l'inverse, dans le groupe traité par immunothérapie, ce statut devient un facteur indépendant prédictif d'une bonne réponse à l'immunothérapie, avec 66% des patients encore en vie à 60 mois, comme décrit dans la littérature (15) (14).
Nous n'avons pas retrouvé ces résultats de manière significative dans la population totale, sans distinguer la prise en charge thérapeutique. La tendance de ce groupe $CD8^+$TIL+/PD-L1+ à être de mauvais pronostic semble masquée dans la population générale par les patients qui ont reçu de l'immunothérapie et dont le pronostic a été amélioré.

Concernant le statut $CD8^+$TIL-/PD-L1-, nous n'avons pas pu montrer une signification pronostique ou prédictive de réponse à l'immunothérapie. Toutefois, le pourcentage de patients en vie à 60 mois dans la population générale et dans les groupes de patients traités ou non par immunothérapie, restait stable aux alentours de 47%. Cela laisse penser que l'absence de lymphocytes $CD8^+$TIL associée à l'absence d'expression de PD-L1 pourrait être un facteur de mauvais pronostic et probablement de non réponse à l'immunothérapie**.** *Teng et al* suggère que, compte tenu de l'absence d'infiltrat lymphocytaire T préexistant fonctionnel, le statut $CD8^+$TIL-/PD-L1- serait associé à un mauvais pronostic et les patients seraient alors probablement non répondeurs à une monothérapie anti-PD1 et qu'ainsi une combinaison d'immunothérapie anti-CTLA4 et anti-PD1 serait bénéfique pour ce type de patients. En effet, les anti-CTLA4 permettraient d'activer précocement les lymphocytes T qui affluraient dans la tumeur et induiraient une expression adaptative de PD-L1, qui serait ensuite la cible des anti-PD1 (15). La combinaison d'immunothérapie n'était pas l'objet de notre étude mais, comme *Larkin* l'a rapporté, elle devrait probablement occuper une place de choix pour les tumeurs n'exprimant pas PD-L1 et il serait donc intéressant d'étudier l'efficacité de cette association d'immunothérapie en fonction des 4 patterns $CD8^+$TIL/PD-L1 (18).

Enfin, le groupe $CD8^+$TIL-/PD-L1+ n'était pas retrouvé comme étant un facteur pronostique ou prédictif d'une réponse à l'immunothérapie dans aucun de nos groupes de patients. Cependant, ce statut, témoignant d'une expression constitutive de PD-L1, est très peu représenté dans notre série, comme dans les différentes séries décrites dans la littérature (16).

D'autre part, de façon surprenante, aucun des statuts $CD8^+$TIL/PD-L1 analysés à partir des 105 premiers prélèvements métastatiques au sein de la population générale, n'était significativement lié à la survie. Cela pourrait éventuellement s'expliquer par le fait que le délai de suivi était raccourci entre ce premier évènement métastatique et le décès et/ou la date des dernières nouvelles. Il semblerait donc plus utile d'analyser la survie globale à partir du mélanome primitif jusqu'au décès (ou à la date des dernières nouvelles). Les analyses plus approfondies au sein des groupes de patients traités ou non par immunothérapie sont actuellement en cours pour cette étude.

En conclusion, notre étude montre que l'expression de PD-L1 seule n'est pas un facteur pronostique ou prédictif robuste chez les patients atteints de mélanomes malins métastatiques, que ce statut soit évalué sur la tumeur primitive ou sur la première métastase apparaissant dans l'évolution de la maladie. Il semble que faire un marquage supplémentaire avec un anti-CD8 et caractériser la population $CD8^+$TIL pourrait permettre de mieux apprécier la survie globale de certains patients et probablement de mieux prédire une réponse thérapeutique.

PERSPECTIVES D'ETUDES

Perspectives en cours suite à notre travail de thèse

De nombreuses perspectives se profilent à partir de notre base de données très exhaustive, partiellement exploitée dans cette étude.

En premier lieu, lors de la lecture des coupes d'IHC PD-L1, nous avons également évalué l'expression de PD-L1 par les cellules immunes ainsi que la disposition de cet infiltrat, observé essentiellement en périphérie, au contact de la tumeur souvent sous forme d'agrégats et/ou intra tumoral sous forme majoritairement de cellules isolées. En effet, certaines études cliniques notamment la Checkmate-067, ont inclus l'expression des cellules immunitaires pour définir la positivité de PD-L1 en conservant un seuil de 5% conduisant donc à des taux de positivité bien plus importants que ceux que nous avons rapportés dans notre travail initial (18). Des analyses identiques sur la survie globale seront donc réalisées en tenant compte de l'intégration des cellules immunes pour définir la positivité de PD-L1. De plus, la localisation de l'infiltrat immunitaire, concentré en périphérie en bordure de la tumeur, serait plus associé à l'efficacité des immunothérapies (14).

Secondairement, nous prévoyons d'analyser l'évolution spatio-temporelle de l'expression de PD-L1, c'est à dire l'évolution pour chaque patient de cette expression dans le temps, selon le site primitif, métastatique régional, à distance, tout cela à partir des prélèvements mélanomes primitifs et métastases appariées dont nous disposons.

Par ailleurs, les patients susceptibles de répondre aux anti-PD-1/PD-L1 seraient ceux qui présentent les tumeurs les plus « immunogènes » en lien avec leur instabilité génétique et leur nombre élevé de mutations (32). Le profil $CD8^{+}$TIL et les 4 statuts $CD8^{+}$TIL/PD-L1 seront corrélés en particulier au statut du gène *BRAF*.

Nous pensons également réaliser les analyses statistiques au sein de groupes thérapeutiques mieux définis en particulier parmi la population de patients traitée par immunothérapie exclusivement. Une étude prospective qui viendrait compléter ces données doit se discuter également avec nos partenaires oncodermatologues.

Des analyses immunohistochimiques sont actuellement élargies à d'autres marqueurs notamment avec les anticorps anti-CD4, anti-CD33, anti-CD15, anti-CD14, et anti-TRF2.
En effet nous avons en particulier pour objectif de voir si dans notre population de 105 patients, à la fois au niveau des sites primitifs et des sites métastatiques, les populations myéloïdes et en particulier les cellules myéloïdes suppressives, ont un impact sur l'expression de PD-L1 au niveau des mélanocytes tumoraux. Pour cela nous avons réalisé récemment l'ensemble des IHC anti-CD33, anti-CD15 et anti-CD14. Nous avons exclu pour le moment de notre analyse, les IHC réalisées avec l'anticorps anti-CD4, et nous voulons contrôler certains résultats obtenus qui nous semblent peu significatifs à ce stade de l'écriture de notre travail de thèse. Enfin nous allons analyser l'expression (nombre de cellules mélanocytaires marquées et intensité du marquage) de TRF2 et essayer de voir si il existe un impact de l'expression de TRF2 sur le nombre de cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement immunitaire des mélanocytes exprimant ou pas PD-L1.

Perspectives pour les tests biologiques prédictifs de l'immunothérapie PD-1/PD-L1 dans un cadre plus général

Les analyses en IHC, bien que pouvant apporter des informations précieuses sur la prédiction aux réponses à l'immunothérapie, présentent des limites, souvent liées à des problèmes d'échantillonnage non représentatif de l'ensemble du processus tumoral. Ainsi d'autres pistes sont actuellement à l'étude et en plein développement et peuvent ainsi se déployer chez des patients atteints de mélanomes malins métastatiques avant l'administration d'une immunothérapie PD-1/PD-L1 :

Evaluation du statut PD-L1 dans le sang

PD-L1 peut être mis en évidence dans le plasma ou sur les cellules tumorales circulantes (CTC). La première étude sur les CTCs a été réalisée chez des patientes présentant un cancer du sein. Très récemment l'expression de PD-L1 a été recherchée sur les CTCs isolées par la méthode de filtration ISET chez des patients atteints d'un cancer pulmonaire métastatique. L'évaluation du statut PD-L1 sur une biopsie liquide pourrait être indiquée chez un patient fragile et/ou si le site tumoral ne peut pas être biopsié ou si la biopsie tissulaire ne comporte qu'un nombre très faible de cellules tumorales. Des patients dont l'immunohistochimie PD-L1 serait négative sur les coupes tissulaires mais dont l'immunocytochimie PD-L1 serait

positive sur les CTCs pourraient ainsi être identifiés. Une telle discordance s'expliquerait par l'hétérogénéité d'expression de PD-L1. Des études en cours ont pour but d'apprécier si le statut PD-L1 dans le sang peut être modifié par les traitements par immunothérapie. La signification de ces changements dans le cadre de l'établissement d'un test d'efficacité thérapeutique ou pronostique doit alors être évaluée. Dans ce même contexte une étude a montré que la diminution de la quantité d'ADN libre circulant tumoral chez les patients traités par immunothérapie anti-PD-1 serait un facteur de bonne réponse thérapeutique. La chute du niveau d'expression d'autres biomarqueurs sanguins comme l'IL-8 serait aussi le reflet de cette efficacité.

Mise en évidence de biomarqueurs de résistance à l'immunothérapie anti PD-L1/PD-1

Des études récentes ont identifié l'expression de certains marqueurs tissulaires, comme la protéine VISTA, comme étant le témoin d'une résistance à l'immunothérapie.

Mise en place de plateforme de multiplexage en IHC

Plusieurs systèmes sont en train d'être développés et testés faisant appel soit à des méthodes combinées d'immunofluorescence soit à l'utilisation de plusieurs chromogènes sur une même coupe tissulaire.

Analyses complexes intégrant des données d'IHC et de génomique

Ces approches associeraient plusieurs tests d'IHC (CD8, mais aussi CD4, PD1, FoxP3, VISTA, etc), l'évaluation de la charge mutationnelle (tumor mutational burden ou TMB), la caractérisation de néo antigènes exprimés à la surface des cellules tumorales, et la signature d'altérations génomiques sur des gènes d'intérêt avec un panel plus ou moins large de gènes à analyser (incluant EGFR ALK ROS1, KRAS, MET, BRAF, HER2 STK11). Hormis la complexité de ces analyses combinées, ces orientations vont entrainer des contraintes sur, i) les délais d'obtention des résultats en routine, ii) le coût global et la prise en charge de ces analyses, iii) la difficulté de pouvoir établir des tests compagnons diagnostiques combinant sur une seule analyse plusieurs cibles d'intérêt, iv) la mise en place de centres experts.

TABLEAUX ET FIGURES

Caractéristiques	Sans Immunothérapie (n=54)	Avec Immunothérapie (n=51)	Total (n=105)	*P-Value**
Sexe - Nbre (%)				*0,30*
Féminin	21 (60,00)	14 (40,00)	35 (33,33)	
Masculin	33 (47,14)	37 (52,86)	70 (66,67)	
Age - années				
Moyenne	66,59	60,55	63,66	*0,031*
Extrêmes	23-92	26-83	23-92	
Type histologique - Nbre (%)				*0,83*
Mélanome superficiel extensif	30 (53,57)	26 (46,43)	56 (53,33)	
Mélanome nodulaire	15 (46,88)	17 (53,12)	32 (30,48)	
Mélanome acral lentigineux	3 (50,00)	3 (50,00)	6 (5,71)	
Mélanome de Dubreuilh invasif	3 (75,00)	1 (25,00)	4 (3,81)	
Mélanome inclassable	3 (42,85)	4 (57,14)	7 (6,67)	
Ulcération - Nbre (%)				*0,77*
Non	25 (49,02)	26 (50,98)	51 (48,57)	
Oui	29 (53,70)	25 (46,30)	54 (51,43)	
pT - Nbre (%)				*0,84*
T1	7 (58,33)	5 (41,67)	12 (11,43)	
T2	10 (55,56)	8 (44,44)	18 (17,14)	
T3	20 (52,63)	18 (47,37)	38 (36,19)	
T4	17 (45,95)	20 (54,05)	37 (35,24)	
pN - Nbre (%)				*0,58*
N0	47 (52,22)	43 (47,78)	90 (85,71)	
N1a	0 (0,00)	1 (100,00)	1 (0,95)	
N1b	0 (0,00)	1 (100,00)	1 (0,95)	
N1c	6 (60,00)	4 (40,00)	10 (9,52)	
N3	1 (33,33)	2 (66,67)	3 (2,86)	
Stade - Nbre (%)				*0,53*
I	13 (61,90)	8 (38,10)	21 (20,00)	
II	34 (50,00)	34 (50,00)	68 (64,76)	
III	7 (46,67)	8 (53,33)	15 (14,28)	
IV	0 (0,00)	1 (100,00)	1 (0,95)	
Statut *BRAF* - Nbre (%)				*0,071*
Muté	25 (62,50)	15 (37,50)	40 (38,10)	
Non muté	29 (44,61)	36 (55,38)	65 (61,90)	

Tableau 1- Données cliniques et histomoléculaires des 105 mélanomes primitifs cutanés
**Comparaison entre le groupe avec immunothérapie et le groupe sans immunothérapie pour chaque variable analysée (Test du Chi 2 ou test T de Student)*

	Statut	Mélanomes primitifs (n=105)	Métastases (n=105)
PD-L1 - Nbre (%)			
	Négatif	70 (66,67)	64 (60,95)
	Positif	35 (33,33)	41 (39,05)
$CD8^+$TIL - Nbre (%)			
	Négatif	41 (39,05)	56 (53,33)
	Positif	64 (60,95)	49 (46,67)
$CD8^+$TIL /PD-L1 - Nbre (%)			
	$CD8^+$TIL-/PD-L1-	34 (32,38)	47 (44,76)
	$CD8^+$TIL-/PD-L1+	7 (6,67)	9 (8,57)
	$CD8^+$TIL+/PD-L1-	36 (34,29)	17 (16,19)
	$CD8^+$TIL+/PD-L1+	28 (26,67)	32 (30,48)

Tableau 2 - Expression PD-L1 et répartition des catégories $CD8^+$TIL et $CD8^+$TIL/PD-L1 au sein des 105 mélanomes primitifs et des 105 premières métastases

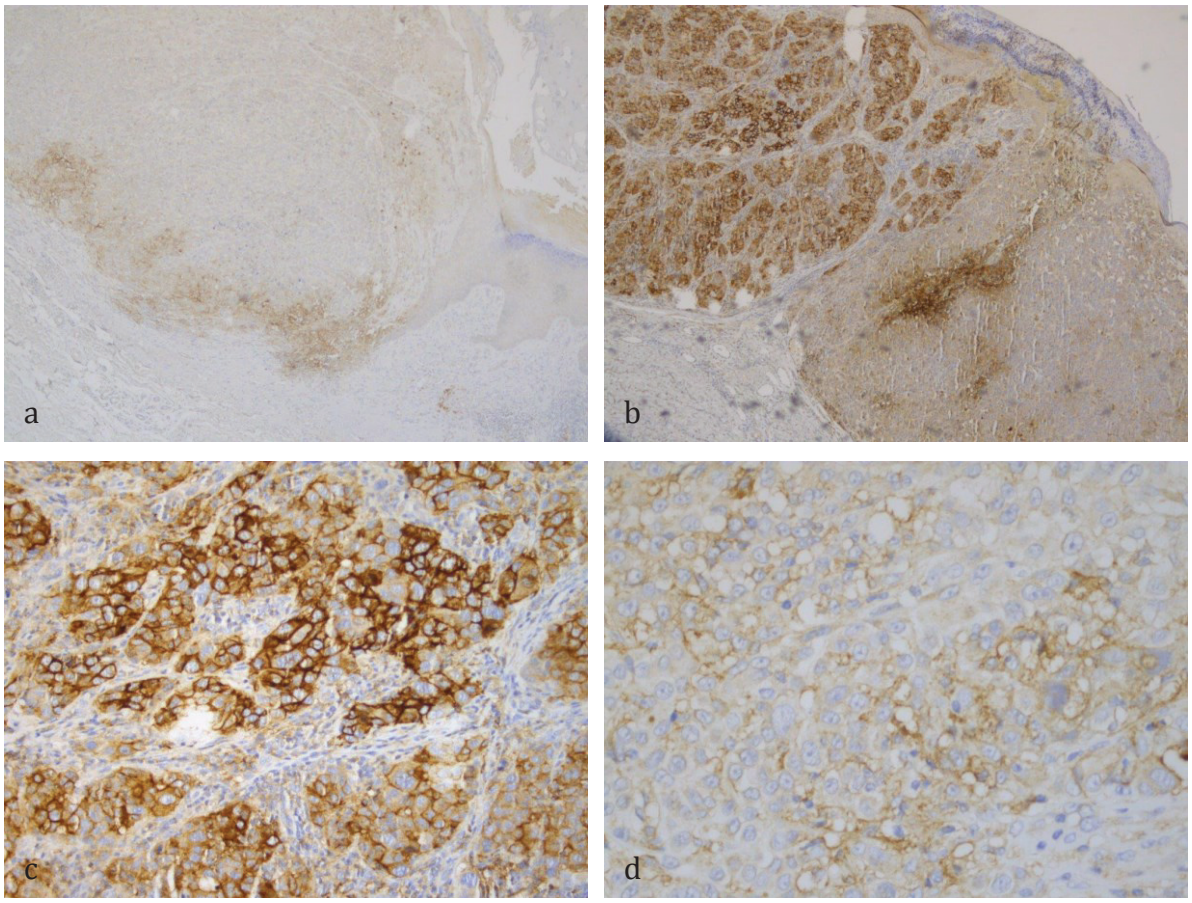

Figure 1- Marquage PD-L1 des cellules tumorales (a) périphérique, 20% (x100) (b) hétérogène, 50% (x100) (c) intense, membranaire (x400) (d) faible à modéré, membranaire (x400)

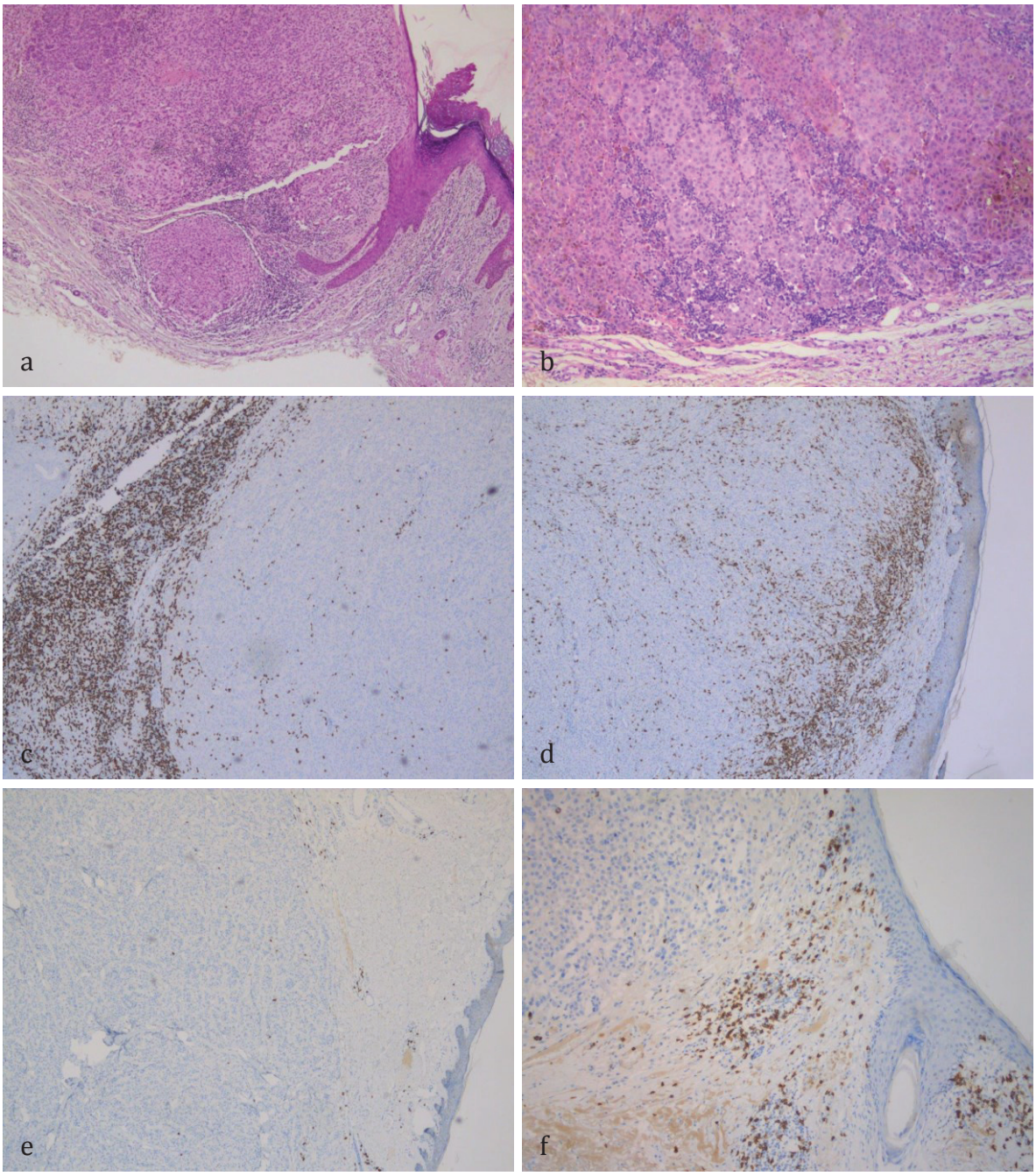

Figure 2- <u>Lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL)</u> : (a) HES x100, (b) HES x 200
<u>TIL CD8+</u> : (c) infiltrat périphérique x 100, (d) infiltrat périphérique et intra tumoral x100
<u>Absence de TIL CD8+</u> : désert immunitaire (e), infiltrat en couronne (f)

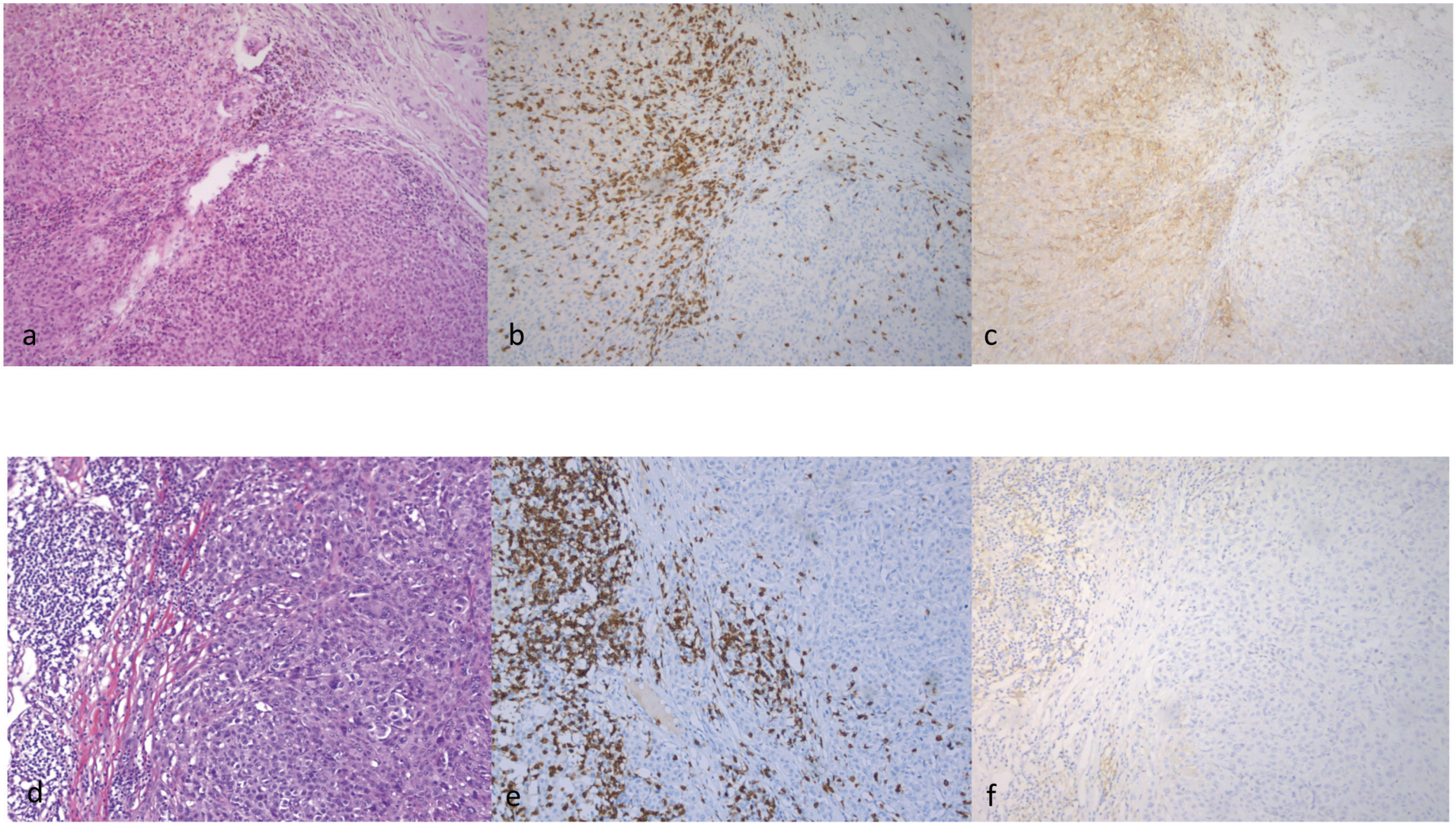

Figure 3. **<u>Groupe CD8⁺TIL+/PD-L1+</u> (x 100) : mélanome avec infiltrat inflammatoire (HES) (a) avec présence de CD8⁺ TIL (b), associée à l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales (c).**
<u>Groupe CD8⁺TIL+/PD-L1-</u> (x 100) : mélanome avec infiltrat inflammatoire (HES) (d) avec présence de CD8⁺ TIL (e) et avec absence d' expression de PD-L1 par les cellules tumorales (f).

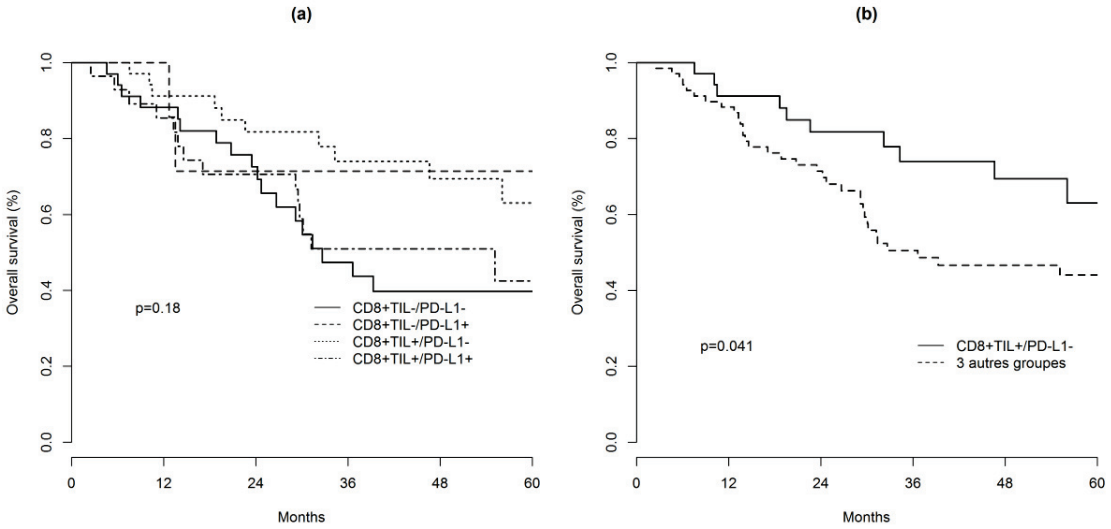

Figure 4. Courbes de Kaplan-Meier : Analyse de la survie globale selon le statut CD8+TIL/ PD-L1 au sein des 105 mélanomes primitifs. Les p-values ont été calculées en utilisant le test du Log-rank.
(a) Analyse des 4 groupes CD8+TIL/PD-L1
(b) Analyse du groupe CD8+TIL+/PD-L1- isolé comparé aux 3 autres groupes

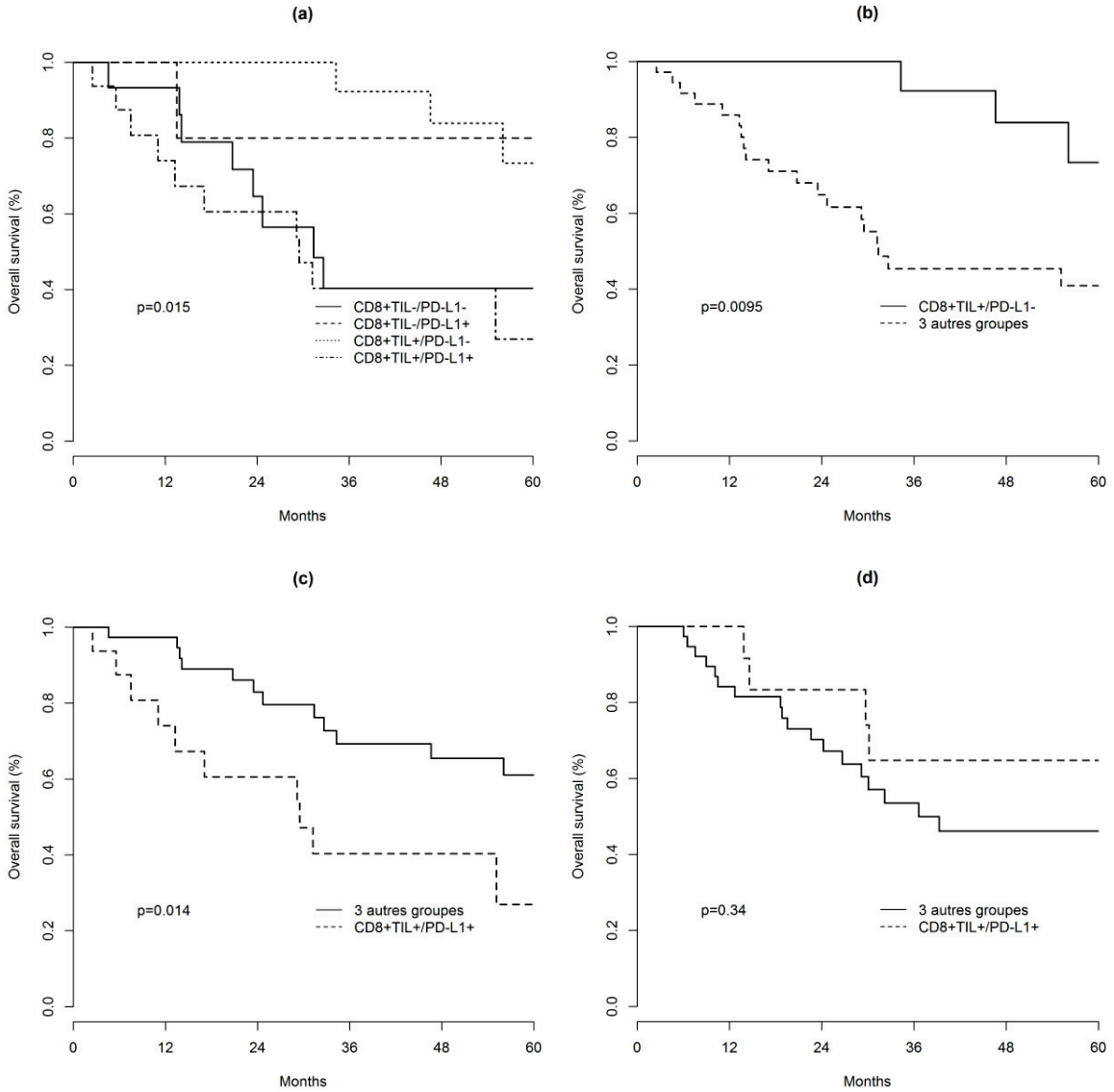

Figure 5. Courbes de Kaplan-Meier: analyse de la survie globale selon le statut CD8^{+}TIL/PD-L1 sur les mélanomes primitifs dans la cohorte non traitée par immunothérapie (n=54) et traitée par immunothérapie (n=51). Les p-values ont été calculées en utilisant le test du Log-rank.
(a) 4 groupes CD8+TIL/PD-L1 chez les patients non traités
(b) groupe CD8+TIL+/PD-L1- isolé comparé aux 3 autres groupes, chez les patients non traités,
(c) groupe CD8+TIL+/PD-L1+ isolé comparé aux 3 autres groupes, chez les patients non traités,
(d) groupe CD8+TIL+/PD-L1+ isolé comparé aux 3 autres groupes, chez les patients traités.

ANNEXES

Variables		Patients en vie n (%)	Patients décédés n (%)	*p*-value
PD-L1				0,50
	NEGATIF	42 (60,00)	28 (40,00)	-
	POSITIF	19 (54,29)	16 (45,71)	-
Statut $CD8^+$TIL				0,27
	NEGATIF	21 (51,22)	20 (48,78)	-
	POSITIF	40 (62,50)	24 (37,50)	-
Groupes $CD8^+$TIL / PD-L1				0,18
	-/-	16 (47,06)	18 (52,94)	-
	-/+	5 (71,43)	2 (28,57)	-
	+/-	26 (72,22)	10 (27,78)	-
	+/+	14 (50,00)	14 (50,00)	-
1 groupe d'intérêt comparé aux 3 autres				0,15
	-/-	16 (47,06)	18 (52,94)	-
	+/+;+/-;-/+	45 (63,38)	26 (36,62)	-
				0,32
	+/+	14 (50,00)	14 (50,00)	-
	-/-;+/-;-/+	47 (61,04)	30 (38,96)	-
				0,62
	-/+	5 (71,43)	2 (28,57)	-
	+/+;-/-;+/-	56 (57,14)	42 (42,86)	-
				0,045
	+/-	26 (72,22)	10 (27,78)	-
	+/+;-/-;-/+	35 (50,72)	34 (49,28)	-

***P*-values ont été générées à partir du test de Logrank et étaient significatives quand *p*<0,05 (indiquées en gras)**

Annexe 1. Analyse univariée de la survie globale selon l'expression de PD-L1, les statuts CD8+TIL et CD8+TIL/ PD-L1 des 105 mélanomes primitifs

$CD8^+$TIL - /PD-L1- (groupe -/-), $CD8^+$TIL - /PD-L1 + (groupe -/+), $CD8^+$TIL+/PD-L1- (groupe +/-) et $CD8^+$TIL + /PD-L1 + (groupe +/+).

Variables		Patients en vie n(%)	Patients décédés n(%)	*p*-value
Statut PD-L1				0,11
	NEGATIF	22 (66,67)	11 (33,33)	-
	POSITIF	10 (47,62)	11 (52,38)	-
Statut CD8^{+}TIL				0,61
	NEGATIF	11 (55,00)	9 (45,00)	-
	POSITIF	21 (61,76)	13 (38,24)	-
Groupes CD8^{+}TIL / PD-L1				**0,015**
	-/-	7 (46,67)	8 (53,33)	-
	-/+	4 (80,00)	1 (20,00)	-
	+/-	15 (83,33)	3 (16,67)	-
	+/+	6 (37,50)	10 (62,50)	-
1 groupe d'intérêt comparé aux 3 autres				0,23
	-/-	7 (46,67)	8 (53,33)	-
	+/+;+/-;-/+	25 (64,10)	14 (35,90)	-
				0,014
	+/+	6 (37,5)	10 (62,50)	-
	-/-;+/-;-/+	26 (68,42)	12 (31,58)	-
				0,36
	-/+	4 (80,00)	1 (20,00)	-
	+/+;-/-;+/-	28 (57,14)	21 (42,86)	-
				0,0094
	+/-	15 (83,33)	3 (16,67)	-
	+/+;-/-;-/+	17 (47,22)	19 (52,78)	-

***P*-values ont été générées à partir du test de Logrank et étaient significatives quand *p*<0,05 (indiquées en gras)**

Annexe 2. Analyse univariée de la survie globale selon l'expression de PD-L1, les statuts CD8+TIL et CD8+TIL/ PD-L1 des 54 patients non traités par immunothérapie.

CD8^{+}TIL - /PD-L1- (groupe -/-), CD8^{+}TIL - /PD-L1 + (groupe -/+), CD8^{+}TIL+/PD-L1- (groupe +/-) et CD8^{+}TIL + /PD-L1 + (groupe +/+).

Variables		Patients en vie n(%)	Patients décédés n(%)	*p*-value
Statut PD-L1				0,50
	NEGATIF	20 (54,05%)	17 (45,95%)	-
	POSITIF	9 (64,29%)	5 (35,71%)	-
Statut $CD8^+$TIL				0,30
	NEGATIF	10 (47,62%)	11 (52,38%)	-
	POSITIF	19 (63,33%)	11 (36,67%)	-
Groupes $CD8^+$TIL / PD-L1				0,63
	-/-	9 (47,37%)	10 (52,63%)	-
	-/+	1 (50,00%)	1 (50,00%)	-
	+/-	11 (61,11%)	7 (38,89%)	-
	+/+	8 (66,67%)	4 (33,33%)	-
1 groupe d'intérêt comparé aux 3 autres				0,42
	-/-	9 (47,37%)	10 (52,63%)	-
	+/+;+/-;-/+	20 (62,50%)	12 (37,50%)	-
				0,34
	+/+	8 (66,67%)	4 (33,33%)	-
	-/-;+/-;-/+	21 (53,85%)	18 (46,15%)	-
				0,41
	-/+	1 (50,00%)	1 (50,00%)	-
	+/+;-/-;+/-	28 (57,14%)	21 (42,86%)	-
				0,86
	+/-	11 (61,11%)	7 (38,89%)	-
	+/+;-/-;-/+	18 (54,55%)	15 (45,45%)	-

***P*-values ont été générées à partir du test de Logrank et étaient significatives quand *p*<0,05 (indiquées en gras)**

Annexe 3. Analyse univariée de la survie globale selon l'expression de PD-L1, le statut CD8+TIL et CD8+TIL/ PD-L1 des 51 patients traités par immunothérapie. $CD8^+$TIL - /PD-L1- (groupe -/-), $CD8^+$TIL - /PD-L1 + (groupe -/+), $CD8^+$TIL+/PD-L1- (groupe +/-) et $CD8^+$TIL + /PD-L1 + (groupe +/+).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Les cancers en France, Les Données, INCa, édition 2015.

2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 1 mars 2015;136(5):E359‑86.

3. Melanoma of the Skin Cancer Stat Facts. https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html

4. Lee J, Kefford R, Carlino M. PD-1 and PD-L1 inhibitors in melanoma treatment: past success, present application and future challenges. Immunotherapy. juin 2016;8(6):733‑46.

5. 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. 28 juin 2012;366(26):2443‑54.

6. Eggermont AMM, Maio M, Robert C. Immune checkpoint inhibitors in melanoma provide the cornerstones for curative therapies. Semin Oncol. juin 2015;42(3):429‑35.

7. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. Crit Rev Oncol Hematol. avr 2016;100:88‑98.

8. 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 Off J Am Assoc Cancer Res. 1 oct 2014;20(19):5064‑74.

9. Massi D, Brusa D, Merelli B, Ciano M, Audrito V, Serra S, et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. déc 2014;25(12):2433‑42.

10. Wang Q, Liu F, Liu L. Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: An updated meta-analysis. Medicine (Baltimore). mai 2017;96(18):e6369.

11. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. Cancer. 1 avr 2010;116(7):1757‑66.

12. Kluger HM, Zito CR, Barr ML, Baine MK, Chiang VLS, Sznol M, et al. Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 juill 2015;21(13):3052‑60.

13. 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. 27 nov 2014;515(7528):563‑7.

14. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 27 nov 2014;515(7528):568‑71.

15. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. 1 juin 2015;75(11):2139‑45.

16. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. Sci Transl Med. 28 mars 2012;4(127):127ra37.

17. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. N Engl J Med. 11 juill 2013;369(2):122‑33.

18. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N Engl J Med. 2 juill 2015;373(1):23‑34.

19. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. N Engl J Med. 22 janv 2015;372(4):320‑30.

20. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. avr 2015;16(4):375‑84.

21. Ilie MI, Lassalle S, Long-Mira E, Bonnetaud C, Bordone O, Lespinet V, et al. Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma: comparative analysis with three DNA-based assays. Thyroid Off J Am Thyroid Assoc. mai 2014;24(5):858‑66.

22. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature. 11 juill 2013;499(7457):214‑8.

23. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat Rev Immunol. avr 2013;13(4):227‑42.

24. Berry S, Taube JM. Innate vs. Adaptive: PD-L1-mediated immune resistance by melanoma. Oncoimmunology. oct 2015;4(10):e1029704.

25. Hansen AR, Siu LL. PD-L1 Testing in Cancer: Challenges in Companion Diagnostic Development. JAMA Oncol. janv 2016;2(1):15‑6.

26. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. Pigment Cell Melanoma Res. mai 2015;28(3):245‑53.

27. Daud AI, Wolchok JD, Robert C, Hwu W-J, Weber JS, Ribas A, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. déc 2016;34(34):4102‑9.

28. Burton AL, Roach BA, Mays MP, Chen AF, Ginter BAR, Vierling AM, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. Am Surg. févr 2011;77(2):188‑92.

29. Lee N, Zakka LR, Mihm MC, Schatton T. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. Pathology (Phila). févr 2016;48(2):177‑87.

30. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. Cancer. 1 avr 1996;77(7):1303‑10.

31. Daud AI, Loo K, Pauli ML, Sanchez-Rodriguez R, Sandoval PM, Taravati K, et al. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. J Clin Invest. 1 sept 2016;126(9):3447‑52.

32. Chabanon RM, Pedrero M, Lefebvre C, Marabelle A, Soria J-C, Postel-Vinay S. Mutational Landscape and Sensitivity to Immune Checkpoint Blockers. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 sept 2016;22(17):4309‑21.

SERMENT HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon Devoir et mon Patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine. Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'Humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.