



HAL
open science

Immunomonitoring phénotypique et fonctionnel de patients atteints de mélanome métastatique sous immunothérapie : recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement

Elisa Angelica Degache-Masperì

► To cite this version:

Elisa Angelica Degache-Masperì. Immunomonitoring phénotypique et fonctionnel de patients atteints de mélanome métastatique sous immunothérapie : recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02884808

HAL Id: dumas-02884808

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02884808v1>

Submitted on 30 Jun 2020

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**IMMUNOMONITORING PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNEL
DE PATIENTS ATTEINTS DE MELANOME METASTATIQUE
SOUS IMMUNOTHERAPIE : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS
PREDICTIFS DE REPONSE AU TRAITEMENT**

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR EN MÉDECINE
SPECIALITE DERMATOLOGIE ET VENEREOLOGIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Elisa Angelica DEGACHE-MASPERI,

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE
Le 6 juillet 2018

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

- Présidente du jury :
 - Mme la Professeure Marie-Thérèse LECCIA
- Membres :
 - Mme la Professeure Julie CHARLES, co-directrice
 - M. le Professeur Pierre HAINAUT
 - Mme le Docteur Laurence CHAPEROT, co-directrice
 - Mme le Docteur Marie MONCOURIER

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	4
REMERCIEMENTS.....	6
SERMENT D'HIPPOCRATE.....	10
ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE.....	11
RESUME.....	15
MOTS CLES	16
ABREVIATIONS.....	16
INTRODUCTION	17
▪ LA REPONSE DU SYSTEME IMMUNITAIRE FACE AU MELANOME	20
▪ LES MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT A L'IMMUNO-SURVEILLANCE	22
▪ LES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRE.....	24
▪ THERAPEUTIQUES ANTI-CTLA-4 ET ANTI-PD-1	25
▪ BIOMARQUEURS PREDICTIFS	26
▪ NOTRE ETUDE	31
MATERIEL ET METHODES	32
▪ PATIENTS	32
▪ PHENOTYPAGE DU SANG TOTAL	34
▪ ACTIVATION DES CELLULES SUR SANG TOTAL.....	35
▪ ISOLATION ET CONGELATION DU PLASMA ET DES CELLULES.....	36
▪ STRATEGIE DE GATING SOUS FLOWJO.....	37
▪ ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES	38
RESULTATS	39
▪ LYMPHOCYTES T CD4 ⁺	40
▪ LYMPHOCYTES T REGULATEURS	45
▪ MDC BDCA3 ⁻	48
▪ MONOCYTES	50

DISCUSSION	53
▪ LYMPHOCYTES T CD4 ⁺	54
▪ LYMPHOCYTES T REGULATEURS	56
▪ MDC BDCA3 ⁻	60
▪ MONOCYTES	61
▪ LIMITES DE L'ETUDE ET PERSPECTIVES.....	62
CONCLUSION	65
ANNEXES	67
▪ ANNEXE 1 (D'APRES GUILLOT ET AL.) - RECOMMANDATIONS DES TRAITEMENTS SYSTEMIQUES DE 1ERE, 2EME ET 3EME LIGNE DES MELANOMES CUTANES METASTATIQUES NON RESECABLES (STADE III INOPERABLES ET STADES IV) HORS METASTASE CEREBRALE.....	67
▪ ANNEXE 2 - STRATEGIE DE GATING SUR TUBE T, TUBE MBNK, TUBE MEL SUIVI	68
▪ ANNEXE 3 - ARBRE DECISIONNEL POUR L'UTILISATION DES TESTS STATISTIQUES	70
▪ ANNEXE 4 - TABLEAU DES ANALYSES COMPARATIVES ENTRE LE GROUPE REPONDEURS ET NON REPONDEURS SUR LES PRINCIPALES SOUS-POPULATIONS DU SYSTEME IMMUNITAIRE, AU PRELEVEMENT 1 ET AU PRELEVEMENT 2	71
▪ ANNEXE 5 - TABLEAU DES ANALYSES COMPARATIVES DE PRODUCTION DE CYTOKINES ENTRE LE GROUPE REPONDEURS ET NON REPONDEURS, AU PRELEVEMENT 1 ET 2, APRES STIMULATION EN PHA.....	72
▪ ANNEXE 6 - TABLEAU DES ANALYSES COMPARATIVES DE PRODUCTION DE CYTOKINES ENTRE LE GROUPE REPONDEURS ET NON REPONDEURS, AU PRELEVEMENT 1 ET 2, APRES STIMULATION AU R848	73
BIBLIOGRAPHIE	74

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES :

FIGURE 1 (D'APRES GALLUZZI ET AL.) - IMMUNOTHERAPIE ANTITUMORALE.	18
FIGURE 2 (D'APRES CHEN ET AL.) - PRINCIPALES VOIES DE CO-STIMULATION ET DE CO-INHIBITION ENTRE CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES ET LYMPHOCYTES T EFFECTEURS	21
FIGURE 3 (D'APRES DUNN ET AL.) - LES 3 E DE L'IMMUNO-SURVEILLANCE.	23
FIGURE 4 (D'APRES CAUX ET AL.) - DIFFERENCE ENTRE LE BLOCAGE CTLA-4/B7 ET LE BLOCAGE PD-1/PD-L1.....	25
FIGURE 5 (D'APRES FRELAU ET AL.) - LES ELEMENTS CLES DU DEVELOPPEMENT DE BIOMARQUEURS DE REPONSE A L'IMMUNOTHERAPIE.....	27
FIGURE 6 - LOGIGRAMME DES ANALYSES REALISEES	36
FIGURE 7 - STRATEGIE DE GATING POUR LE TUBE DC	37
FIGURE 8A - FREQUENCE DES LT CD4 ⁺ AU P1 FIGURE 8B - FREQUENCE DES LT CD4 ⁺ AU P2.....	41
FIGURE 9 - EVOLUTION DES LT CD4 ⁺ AU COURS DU TEMPS POUR LES DEUX GROUPES.....	41
FIGURE 10 - CORRELATION ENTRE LA NUMERATION DE LT DC4 ⁺ (cell/mL) ET LES CYTOKINES IL-2 (p<0,05), IL-4 (p<0,01), IL-9 (p<0,001) ET IL-13 (p<0,01) (pg/mL) EN STIMULATION PHA	42
FIGURE 11 - COMPARAISON DE LA PRODUCTION D'IL-4 CHEZ LES REPONDEURS ET NON REPONDEURS AU P1 (GAUCHE) ET AU P2 (DROITE) EN PHA.....	43
FIGURE 12 - COMPARAISON DE LA PRODUCTION D'IL-9 CHEZ LES REPONDEURS ET NON REPONDEURS AU P1 (GAUCHE) ET AU P2 (DROITE) EN PHA.....	43
FIGURE 13 - COMPARAISON DE LA PRODUCTION D'IL-13 CHEZ LES REPONDEURS ET NON REPONDEURS AU P1 (GAUCHE) ET AU P2 (DROITE) EN PHA.....	44
FIGURE 14 - NUMERATION DES LTh2 AU P1 (A GAUCHE) ET AU P2 (A DROITE).....	45
FIGURE 15 - FREQUENCE DES T REG AU P1 (A GAUCHE) ET AU P2 (A DROITE)	46
FIGURE 16 - EVOLUTION DES T REG AU COURS DU TEMPS POUR LES DEUX GROUPES.....	46
FIGURE 17 - CORRELATION ENTRE LA FREQUENCE DES TREG (%MNC) ET LA CONCENTRATION EN IL-10 (pg/mL) EN STIMULATION PHA	47
FIGURE 18 - COMPARAISON DE LA PRODUCTION D'IL-10 (pg/mL) APRES STIMULATION EN PHA ENTRE REPONDEURS ET NON REPONDEURS AU P1 (A GAUCHE) ET P2 (A DROITE).....	47
FIGURE 19 - FREQUENCE DES MDC BDCA3 ⁻ AU P1 (A GAUCHE) ET AU P2 (A DROITE).....	48
FIGURE 20 - FREQUENCE DES MDC BDCA3 ⁻ AU COURS DU TEMPS DANS LES DEUX GROUPES	49
FIGURE 21 - BOXPLOTS COMPARATIFS ENTRE REPONDEURS ET NON-REPONDEURS SUR L'EXPRESSION DES MARQUEURS CD86, CD66B ET CD16 (DE GAUCHE A DROITE) AVANT TRAITEMENT	49
FIGURE 22 - COMPARAISON DE LA FREQUENCE DES MONOCYTES CD14 ⁺ CD16 ⁻ ENTRE REPONDEUR ET NON REPONDEUR, AU P1 (A GAUCHE) ET AU P2 (A DROITE)	50

FIGURE 23 - BOXPLOTS COMPARATIFS ENTRE PATIENTS REPONDEURS ET NON REPONDEURS DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS CD86, CD66B, CRTH2 ET CD127 (DE HAUT EN BAS ET DE GAUCHE A DROITE) AVANT TRAITEMENT	51
FIGURE 24 (D'APRES SASIDHARAN NAIR ET AL.) - EFFET DES ANTI-PD-1/ANTI-PD-L1 SUR LES T REG	59

TABLEAUX :

TABLEAU 1 - COHORTE DE PATIENTS	34
TABLEAU 2 - MIX D'ANTICORPS UTILISES POUR LES TUBES DC, T, MBNK ET MEL SUIVI.....	35
TABLEAU 3 - ANALYSES COMPARATIVES ENTRE GROUPE REPONDEUR ET NON REPONDEUR AU PREMIER ET DEUXIEME PRELEVEMENT	40

REMERCIEMENTS

A mes enseignants,

A Madame la Professeure Julie Charles, merci de m'avoir guidée, conseillée et encouragée tout au long de cet exercice. Ton intérêt permanent pour la recherche, ta professionnalité et ta sensibilité sont un exemple pour moi depuis le début de mon internat. J'espère avoir été à la hauteur.

A Madame la Professeure Marie-Thérèse Leccia, merci de me faire l'honneur de présider ma thèse. Merci pour votre accessibilité et votre écoute tout au long de l'internat, à chacune de mes questions. Vos valeurs et votre force sont une véritable inspiration.

A Madame le Docteur Laurence Chaperot, merci d'avoir dirigé cette recherche et de m'avoir fait confiance pour ce travail.

A Monsieur le Professeur Pierre Hainaut, merci de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

A Madame le Docteur Marie Moncourier, merci de faire partie de mon jury de thèse. Travailler avec toi a depuis le début été un immense plaisir et je n'oublierai jamais ton rire dans les ascenseurs de l'hôpital.

A Khemary, je te suis infiniment reconnaissante pour ce travail qui n'aurait pu être possible sans toi. Ce fut une chance de travailler avec toi, merci pour ta disponibilité, ton soutien et ta réassurance quand j'en ai eu besoin.

A Sabiha, merci pour tout ce que tu m'apprends au quotidien, pour ta gentillesse et ta sagesse. J'espère un jour pouvoir avoir tes yeux et ta rigueur est un exemple pour nous toutes.

A Isabelle et Alexandrine, depuis mon arrivée en dermatologie je mesurais la chance de vous avoir à mes côtés. Merci pour votre encadrement, votre enseignement et votre bonne humeur.

A Pauline, Mathilde et Karima, merci pour votre enseignement continu et sans relâche, pour votre investissement dans la transmission des connaissances et pour votre encadrement.

A Laetitia, Stéphane et Oana, mes trois premiers chefs, merci de m'avoir supportée en tant que bébé interne et de m'avoir donné le feeling de la cancérologie et des soins palliatifs.

A Julie, Anne-Claire et Bénédicte, merci pour ces six mois d'apprentissage à vos côtés, travailler au CHANGE avec une équipe comme la vôtre a été une expérience extrêmement enrichissante, tant sur le plan humain que professionnel.

A Isabelle et Marie-Odile, et à Estelle, Jean-Michel et Arnaud : quel beau semestre à vos côtés, merci pour votre enseignement, vos valeurs et votre humour. La pause chocolat de 11h30 est devenue une obligation maintenant !

A Alexandre, Elise, Iolanda, merci pour ce magnifique semestre, vous êtes la bonne humeur, la curiosité intellectuelle et la professionnalité du CHANGE. Merci d'avoir toléré mes absences pour cette thèse (et autres !). Merci à toute l'équipe de radiothérapie pour votre

gentillesse et à mon super co-interne à temps partiel Thomas, merci d'avoir partagé ce stage avec moi !

A l'équipe de dermatologie de Grenoble, du 11ème C, de l'hôpital de jour, d'allergologie et de consultation, merci pour votre esprit d'équipe, vous êtes une vraie famille et c'est une chance de pouvoir compter sur vous.

A Juliana, pour ta patience et ta méthode, ton organisation est exemplaire, merci de t'occuper si bien de ce service et de nous tous.

A tous mes patients et familles de patients, qui sont les premiers enseignants et dont certaines histoires sont indélébiles.

A ma Famille,

A mes parents, j'avais bien promis de ne pas faire comme vous, et pourtant me voici... C'est la preuve que vous êtes le plus bel exemple que je puisse avoir. Merci de votre amour incommensurable et de votre confiance aveugle. Grazie per tutto quello che ci avete dato e insegnato.

A mia Mamma, grazie di avermi portata dalla dermatologa al liceo, grazie di avere mandato a f***** i professori di matematica, scienze... grazie semplicemente di avere creduto in me, dall'inizio alla fine, e del tuo aiuto che mi dai ogni giorno.

A mon Père, merci d'avoir toujours été là, depuis le premier jour lors de l'inscription dans cette faculté jusqu'à mon concours de l'ECN où tes pizzas ont rythmé mes 3 jours de concours, à tous mes repas, petit-déjeuner et goûter compris, c'est grâce à elles que je suis là.

A ma sœur, Anaïs, merci d'exister tout simplement, merci d'avoir partagé la P1 avec moi, où je t'obligeais à être là à toutes mes pauses pour me divertir ou me consoler, je n'aurais pu réussir sans toi.

A mia Nonna, il mio più grande esempio, sei una forza della vita. Grazie per tutti i tuoi consigli, per la tua saggezza, hai ancora così tante cose da insegnarmi.

A ma Mamie, cette force de la nature, merci d'être présente en ce jour tellement important pour moi.

A toute ma famille, italienne et française, merci pour tous ces moments de convivialité partagés, c'est cette unité qui fait notre force.

A ma belle-famille, à Marie-Hélène, Christophe, Cyrielle et Maxime, quelle magnifique rencontre. Merci pour votre accompagnement tout au long de ces derniers mois.

A Pierrick, tu es mon équilibre, mon bonheur et chaque jour je mesure la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés. Merci pour ton aide, pour la diminution de ma charge mentale, pour la patience que tu as avec moi, et pour toutes tes attentions qui font que je ne pourrais plus faire sans. Place à nos projets maintenant.

A mes co-internes et amies,

A Julia, Amélie, Clémentine, Margaux, Josépha, l'internat sans vous je l'imagine même pas !
Merci pour tous ces moments partagés, des galères en stage à nos délires en formations ...
Vous êtes des co-internes en or.

A Camille, Julia et Amélie, vous avez été mes exemples, merci de m'avoir guidée et rassurée.

A Clémentine ma co interne de promo, à toi de jouer maintenant !

A Margaux, à nos potins et nos délires, je croise les doigts pour que nos plans futurs fonctionnent !!

A Josepha, merci de m'avoir soutenue et accordé du temps sur ces dernières semaines, tu es une fille géniale.

A Emmanuelle et Lisa, ça a été trop top de partager ce DIU avec vous et à Pauline et Cédric, vous êtes la relève, on compte sur vous !

A mes amis,

A mes grosses guenilles, Charline Charlotte et Juju. A nos mercredi et samedi après-midi sur les bottes de paille à la Jum, à nos week-ends de concours, à nos premières soirées. Merci de tout l'amour que vous me donnez depuis nos 10 ans, je sais que celui-là restera à tout jamais.

A Jules et Sara, le trio gagnant : merci d'avoir partagé cette année d'enfer de P1 avec moi, vous êtes mes deux tiers sans qui je ne serais pas là.

A Eva, ma coloc de rêve. On a passé nos deux plus dures années ensemble, merci pour ton soutien, ta bienveillance et ta joie de vivre.

A mon trio de choc, Eva Charlotte et Vera pendant la D4, à notre force d'avoir été ensemble, merci pour votre bonne humeur, vos petits plats et toutes vos attentions qui font qu'on est arrivées là.

A Verane, quelle magnifique rencontre. Merci pour toutes tes leçons de vies, tes conseils, ton soutien... Merci d'être toujours là et à n'importe quel moment pour moi.

A Marjo, merci pour toutes ces années ensemble depuis la P2 et tous ces souvenirs partagés, tu es une femme formidable et j'espère te garder le plus longtemps possible à mes côtés.

A Margaux, mon quatre mains, merci pour ta folie et ton sourire, je sais que tu es un soutien solide sur lequel je peux compter quoi qu'il arrive.

A toute la bande des AAaaAA Laurie, Lucas, Lukas, Poulet, Dona, Adri, Ariane, Babe... de la P2 à la D4 vous avez été parfaits, merci pour toutes vos conneries à la salle et en dehors, vous m'avez fait tenir bon.

A Morgane, Laurent, Lucie, Adrien, Théotime, Dysmas... à toutes ces magnifiques rencontres pendant l'internat, merci d'avoir partagé des chambres, des apparts, des stages avec moi. Ces quatre ans sont remplis de souvenirs grâce à vous.

A Dorian, merci pour ton accueil tout au long de cette dernière année, tu es un pilier sur lequel je peux toujours compter.

A mes ressources,

A Pam, qui m'a mis en selle et qui m'a attachée à tout jamais à cette passion. A Angel, qui m'a donné une bouffée d'air frais et m'a fait lâcher prise en D4. A Caporal, qui me donne une satisfaction immense au quotidien.

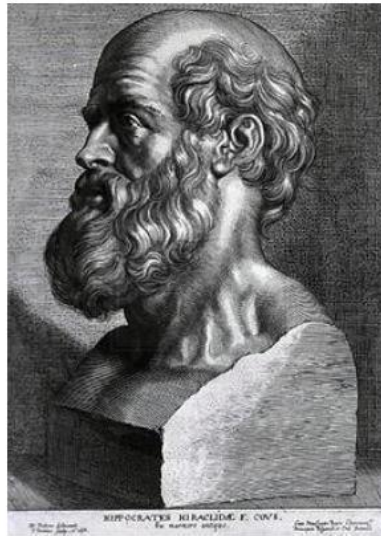
A Shana, Gipsy, Lotus et à Napoléon qui est fixé devant l'écran et qui me relit bien attentivement.

« Connaître ce n'est pas démontrer ni expliquer. C'est accéder à la vision...

Cela est dur apprentissage. »

Antoine de Saint Exupéry

SERMENT D'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 donnerai 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.

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE



Doyen de la Faculté : Pr. Patrice MORAND

Année 2017-2018

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie

PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie générale
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaëtan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
PU-PH	GUEBRE-EGZLABHER Fitsum	Néphrologie
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie

PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU - PH	LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie

PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Virologie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale

MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

RESUME

L'immunothérapie par anti-CTLA-4 et anti-PD-1 a révolutionné le champ des thérapeutiques anticancéreuses et le pronostic des patients atteints de mélanome métastatique. Malgré ces avancées, certains patients n'ont pas de bénéfice au traitement. La recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse est d'un grand intérêt afin d'adapter au mieux le traitement pour chaque patient. Nous avons analysé par cytométrie en flux les cellules du système immunitaire de dix-neuf patients atteints de mélanome métastatique, leur niveau de différenciation et d'activation ainsi que leur production en cytokines. Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus chez les patients répondeurs et non répondeurs, avant et après le début du traitement par immunothérapie. Chez les patients répondeurs, nous retrouvons une fréquence significativement plus élevée des LT CD4⁺ avant et après le début du traitement, associée à une sécrétion plus importante d'IL-4, IL-13 et IL-9. Les patients répondeurs présentent également une fréquence plus élevée de lymphocytes T reg avant le traitement. De plus, les mDC et monocytes ont un profil cellulaire plus activé chez les patients répondeurs. Ces données suggèrent d'une part un rôle actif des LT CD4⁺ LTh2 et LTh9 dans l'activité antitumorale en lien avec l'immunothérapie et d'autre part un effet de l'immunothérapie via les lymphocytes T reg. Nous présentons ici les résultats préliminaires de ces données qui sont nombreuses et dont l'analyse complète devrait nous permettre de mieux comprendre le système immunitaire des patients en situation tumorale, afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique ainsi que la gestion des effets secondaires liés au traitement.

MOTS CLES

Anti-CTLA-4, anti-PD-1, biomarqueur, bloqueurs de points de contrôle immunitaire, cellules dendritiques, cytométrie en flux, cytokines, immunomonitoring, immunophénotypage, immunothérapie, lymphocytes T régulateurs, mélanome métastatique, monocytes

ABREVIATIONS

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

CBNPC : Cancer Bronchique Non à Petites Cellules

CD : Cluster of Differentiation

CD25 : chaine alpha du récepteur à l'IL-2

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4

DC : Cellules Dendritiques

mDC : Cellules Dendritiques myéloïdes

pDC : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes

EILI : Effets Indésirables Liés à l'Immunité

FDA : Food and Drug Administration

FoxP3 : Forkhead box P3

IL : InterLeukine

INCA : Institut National Cancer

INF- γ : Interféron γ

LT : Lymphocytes T

LTh1 : Lymphocytes T helper 1

LTh2 : Lymphocytes T helper 2

LTh9 : Lymphocytes T helper 9

LB : Lymphocytes B

MFI : Intensité Moyenne de Fluorescence

NK : cellules Natural Killers

NKT : Lymphocytes T Natural Killers

P1 : Premier prélèvement

P2 : Deuxième prélèvement

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Pattern

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique

PD-1 : Programmed Death 1

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

PHA : Phytohémagglutinine A

RECIST : Response Evaluation Criteria In Solid Tumors

TA : Température Ambiante

TCR : T-Cell Receptor

TIL : Lymphocytes Infiltrant la Tumeur

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

T reg : Lymphocytes T régulateurs

INTRODUCTION

Ces dernières années ont été marquées par des avancées considérables dans le domaine du traitement des mélanomes métastatiques de stade III inopérables et de stade IV. Les connaissances dans le champ de l'immunothérapie et plus spécifiquement de l'immunothérapie des cancers n'ont cessé de croître et ont permis une véritable modification du paysage thérapeutique avec l'arrivée des bloqueurs de points de contrôle immunitaire ou « immune checkpoints inhibitors » : les anticorps monoclonaux anti-CTLA-4, anti-PD-1 et anti-PD-L1. L'immunothérapie a ainsi permis de transformer le pronostic des patients atteints de mélanome à un stade avancé, patients pour lesquels il y a une dizaine d'année, le traitement systémique de référence reposait principalement sur la chimiothérapie standard par dacarbazine avec des taux de survie de 10 à 15% à 5 ans et une médiane de survie de 8 à 10 mois (1).

Malgré ces avancées thérapeutiques, certains patients n'ont pas de bénéfice durable sous traitement voire ne présentent aucun bénéfice. En effet, les taux de réponse objective pour les immunothérapies par anti-PD-1 sont d'environ 35 % tandis que les taux de survie globale sont autour de 50% à deux ans (2-4). Par ailleurs, ces traitements peuvent induire de nombreux effets secondaires, appelés « effets indésirables liés à l'immunité » (EILI), pouvant parfois nécessiter un arrêt du traitement (5). Plus inquiétant encore, on retrouve dans la littérature, des cas d'hyperprogression liés à l'immunothérapie, qui correspondent à une augmentation rapide et incontrôlable de la masse tumorale dès le début du traitement (6,7).

Le champ de l'immunothérapie est vaste et nous sommes seulement à l'aube de la compréhension des multiples interactions du système immunitaire avec la tumeur et donc

des différentes possibilités thérapeutiques. L'espoir généré par cette approche est immense et d'autres formes d'immunothérapie ont été et sont toujours étudiées, parmi lesquelles nous pouvons citer la vaccination antitumorale par les cellules dendritiques ou par des peptides, le transfert adoptif de lymphocytes T (LT) spécifiques de tumeur, l'injection de cytokines, ou encore l'inhibition des lymphocytes T régulateurs (T reg) (8,9). (Figure 1)

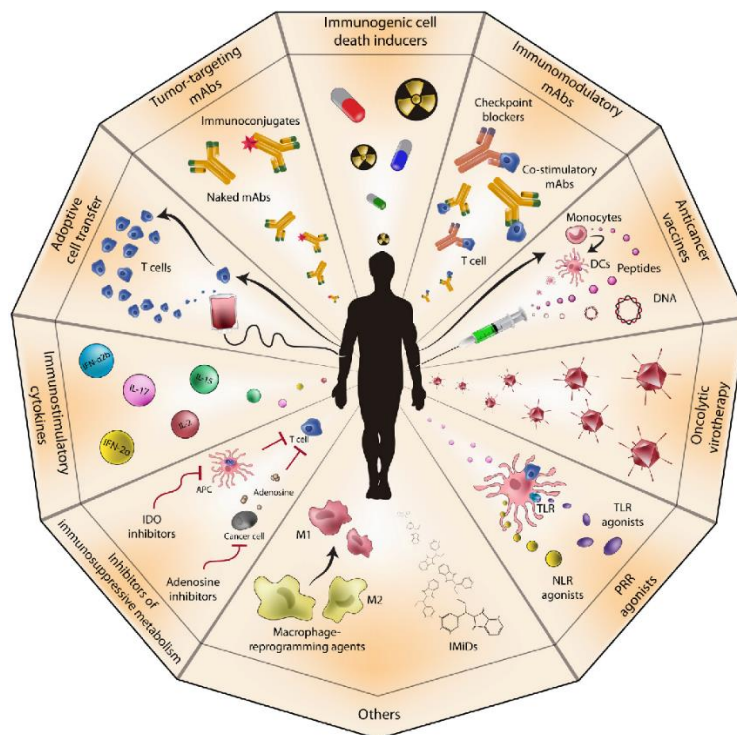


Figure 1 (d'après Galluzzi et al.) - Immunothérapie antitumorale. De multiples voies d'immunothérapie anti-cancéreuse ont été développées ces dernières années dont les principales sont les anticorps monoclonaux, les thérapies ciblées, la vaccination antitumorale, le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de tumeur, l'injection de cytokines, l'inhibition des lymphocytes T régulateurs.

Ces éléments nous imposent l'objectif de trouver, dans un futur proche, des biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie, afin de mieux guider le choix du clinicien dans l'arsenal thérapeutique qui sera à sa portée. Ces biomarqueurs auront comme objectif non seulement de mieux déterminer quel profil de patients bénéficiera le plus d'une thérapie spécifique avant le début de celle-ci mais également de prédire les possibles effets secondaires liés à ces thérapies et ainsi de mieux évaluer la balance bénéfique/risque pour les différents

traitements. La définition de ces biomarqueurs sera une étape essentielle à la personnalisation du traitement de chaque patient, en fonction des propriétés de son système immunitaire et des caractéristiques de sa tumeur, et permettra de développer le concept d'immunothérapie ciblée personnalisée qui se profile pour les années à venir. C'est dans cet objectif que nous avons réalisé cette étude.

Dans un premier temps, nous présenterons les données connues sur les liens étroits qui lient le mélanome et le système immunitaire. Nous développerons ensuite les mécanismes de fonctionnement des immunothérapies anti-CTLA-4 et anti-PD-1. Nous verrons aussi quelles pistes de recherches ont déjà été étudiées dans l'objectif de développer des biomarqueurs prédictifs de réponse à ces traitements.

Dans un second temps, nous exposerons les résultats de cette étude qui s'est déroulée entre 2015 et 2018, au laboratoire de Recherche et Développement de l'Établissement Français du Sang Rhône-Alpes. Cette étude a été réalisée grâce à une étroite collaboration entre le service d'Hôpital de Jour de Dermatologie (Service de Dermatologie et Pôle Pluridisciplinaire de Médecine, Pr M.-T. Leccia) du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, sous la direction de Mme la Professeure J. Charles, et l'équipe de recherche et développement de l'Établissement Français du Sang « Immunologie et Immunothérapie des maladies chroniques » labellisée INSERM U 1209/CNRS UMR 5309/Centre de recherche UGA, au sein de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences, sous la direction de Mme le Docteur L. Chaperot.

▪ *La réponse du système immunitaire face au mélanome*

Le mélanome est une tumeur étroitement liée au système immunitaire, comme en témoignent l'imprévisibilité de son évolutivité et l'existence de mélanomes métastatiques de primitifs inconnus, très probablement liés à des phénomènes de régression spontanée.

La faculté du système immunitaire à reconnaître et à se défendre contre la transformation des cellules normales en cellules tumorales repose sur un double mécanisme de défense, dont les actions sont parallèles et complémentaires : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée correspond à une réponse immunitaire immédiate, non spécifique, et repose sur des mécanismes humoraux (complément, cytokines, protéines) et cellulaires dont les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les mastocytes, les lymphocytes $T\gamma/\delta$, les lymphocytes T Natural Killer (NKT) et les cellules Natural Killer (NK). Elle est déclenchée par la présence de signaux de danger libérés par la cellule tumorale. Les DC, cellules présentatrices d'antigènes dites professionnelles, ont une capacité importante à leur stade immature de reconnaissance des signaux de danger qui conduit à leur activation rapide. Ces signaux de danger sont des motifs hautement conservés appelés PAMPs « Pathogen Associated Molecular Pattern » composés principalement de fragments d'acides nucléiques reconnus par des récepteurs spécifiques de l'immunité innée tels que les TLR « Toll Like Receptor » exprimés principalement par les cellules dendritiques.

Les DC sont également capables de capter et présenter des antigènes tumoraux qui sont ainsi internalisés puis apprêtés, c'est-à-dire clivés en peptides par la cellule dendritique pour être associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Les DC migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques, où elles présentent les antigènes tumoraux

aux lymphocytes T spécifiques de l'antigène CD4⁺ et CD8⁺ cytotoxiques via les molécules du CMH de classe I ou II respectivement et induisent ainsi l'initiation de la réponse immune antitumorale. Les DC matures expriment à leur surface de grandes quantités de molécules de co-stimulation qui seront indispensables à l'activation des lymphocytes (Figure 2). Par ces mécanismes, elles jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance de la distinction entre le « soi » et le « non-soi » et font le lien entre immunité innée et adaptative (8,10).

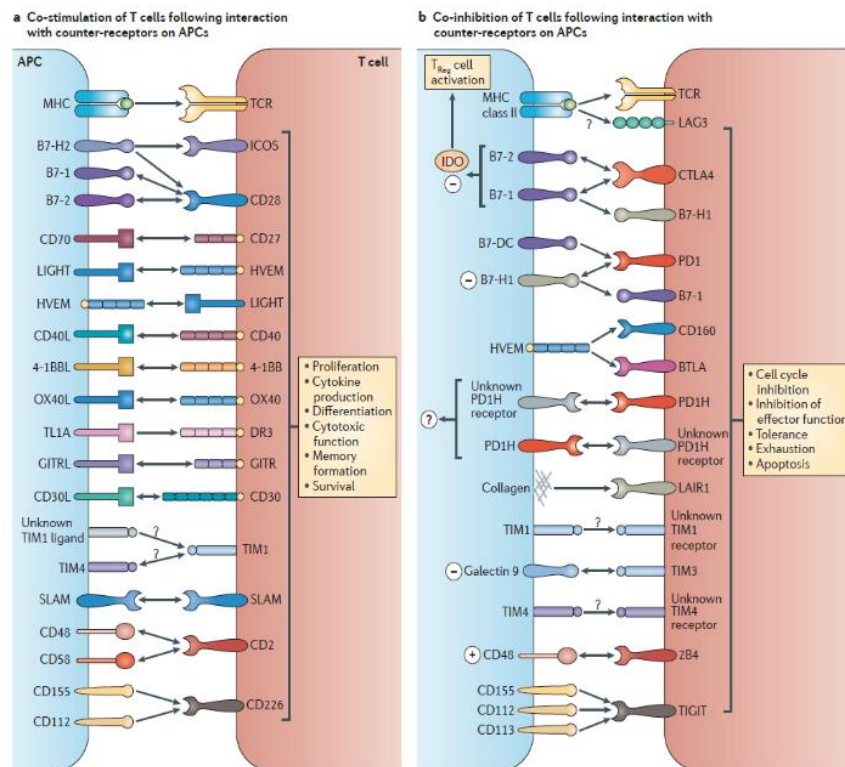


Figure 2 (d'après Chen et al) - Principales voies de co-stimulation et de co-inhibition entre cellules présentatrices d'antigènes et lymphocytes T effecteurs

L'immunité adaptative est une réponse spécifique à l'antigène, médiée par les lymphocytes T CD3⁺ (T CD4⁺ et T CD8⁺) et les lymphocytes B (LB). En contexte tumoral, c'est principalement l'immunité des lymphocytes T qui entre en jeu. Après présentation par les cellules présentatrices d'antigènes, l'antigène va être reconnu par le récepteur du lymphocyte T (TCR) qui va de ce fait s'activer et se différencier en fonction des différentes

cytokines produites. Plusieurs sous-populations de LT CD4⁺ ont été décrites : les lymphocytes Th 1 (LTh1) ont un rôle antitumoral majeur par la sécrétion de l'INF- γ , du TNF- α et de l'IL-2. Les lymphocytes Th 2 (LTh2) sécrètent majoritairement l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et ont un rôle dans la différenciation des LB pour la production d'anticorps. Les lymphocytes Th 17 (LTh17) produisent l'IL-17 et l'IL-22 ; les lymphocytes Th 9 (LTh9) produisent de l'IL-9 et seraient induits à partir des LTh2 sous l'influence du TGF- β . Enfin, les lymphocytes T régulateurs qui peuvent avoir une origine naturelle c'est-à-dire produits dans le thymus mais également périphérique c'est-à-dire développés à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs, sécrètent de l'IL-10 et diminuent la production d'IL-2 (11,12). Les lymphocytes T CD8⁺ vont quant à eux migrer vers les cellules tumorales où ils vont pouvoir exercer leurs fonctions cytotoxiques.

▪ ***Les mécanismes d'échappement à l'immuno-surveillance***

Lors de la progression tumorale, le système immunitaire est ainsi capable de détecter les cellules cancéreuses dès leur apparition et de les détruire avant la formation d'une tumeur cliniquement détectable. Ce processus est nommé l'immuno-surveillance antitumorale (8).

Cependant, certains mécanismes vont permettre à la cellule tumorale de pouvoir se développer malgré cette pression du système immunitaire, c'est la phase d'échappement à l'immuno-surveillance. Cette phase est précédée par une phase d'équilibre, relation dynamique entre le système immunitaire et la tumeur, durant laquelle les cellules tumorales restent dormantes et où le système immunitaire n'est pas capable de les éradiquer totalement. Cette phase d'équilibre peut durer plusieurs années (8,13–15). (Figure 3)

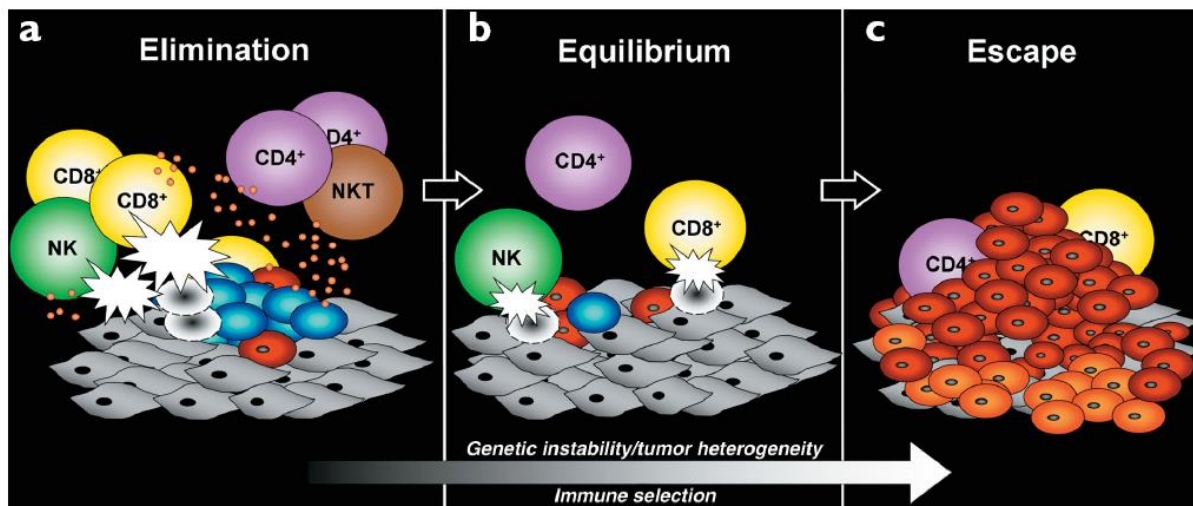


Figure 3 (d'après Dunn et al.) - Les 3 E de l'immuno-surveillance ; a. Phase d'élimination, b. Phase d'équilibre, c. Phase d'échappement.

La phase d'échappement à l'immuno-surveillance survient par deux grands mécanismes de contournement de la réponse immunitaire par la cellule tumorale et lui permet ainsi de se développer, se multiplier et envahir les tissus voisins ou à distance de la tumeur primitive. Le premier est l'immuno-sélection, qui est engendrée par la pression de sélection exercée par le système immunitaire sur la tumeur et aboutit à la sélection de cellules tumorales non reconnues par le système immunitaire. Les mécanismes de l'immuno-sélection sont multiples, parmi lesquels la perte des antigènes tumoraux, la perte des ligands activateurs des cellules NK, des défauts dans la voie de présentation de l'antigène ou encore la perte de réponse à l'INF- γ (8,14).

Le deuxième mécanisme est l'immuno-subversion, qui correspond au recrutement des cellules immunosuppressives et parallèlement, à l'inhibition des fonctions des cellules antitumorales. Les cellules immunosuppressives sont représentées par les T reg, les macrophages, les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC). Les processus d'inhibition des fonctions des cellules antitumorales par la tumeur sont multiples, l'un d'eux nous intéressera tout particulièrement : il s'agit de l'expression par la tumeur ou par le micro-

environnement tumoral de ligands des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes : CTLA-4 et PD-1 entre autres, appelés « points de contrôle immunitaire ». La capacité par la tumeur de moduler l'expression des points de contrôle immunitaire est un des mécanismes essentiels à l'immuno-subversion et ainsi à l'échappement tumoral (8,14,16).

- ***Les points de contrôle immunitaire***

En situation physiologique, ces points de contrôle immunitaire ont un rôle central dans la régulation et la modulation de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire ainsi que dans le maintien de la tolérance du soi. Nous développerons ici les deux principaux points de contrôle connus qui ont permis le développement à visée thérapeutique des bloqueurs des points de contrôle immunitaire.

CTLA-4 est une molécule inhibitrice présente à la surface du lymphocyte T activé, dont les ligands B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) se présentent à la surface des cellules dendritiques. Il s'agit des mêmes ligands que ceux du CD28, principale molécule de co-stimulation présente à la surface du lymphocyte, qui sera donc en compétition avec le CTLA-4. La liaison du couple CTLA-4 ~ B7 va entraîner une cascade de voies de signalisations intracellulaires et en particulier la liaison du motif YVKM avec la tyrosine phosphatase SHP2 et la sérine/thréonine phosphatase PP2A. SHP2 et PP2A vont induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'arrêt de la production de cytokines par l'inhibition de la signalisation proximale du TCR. La voie du CTLA-4 va ainsi avoir un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immune lors de la phase d'initiation induite par les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques (8).
(Figure 4)

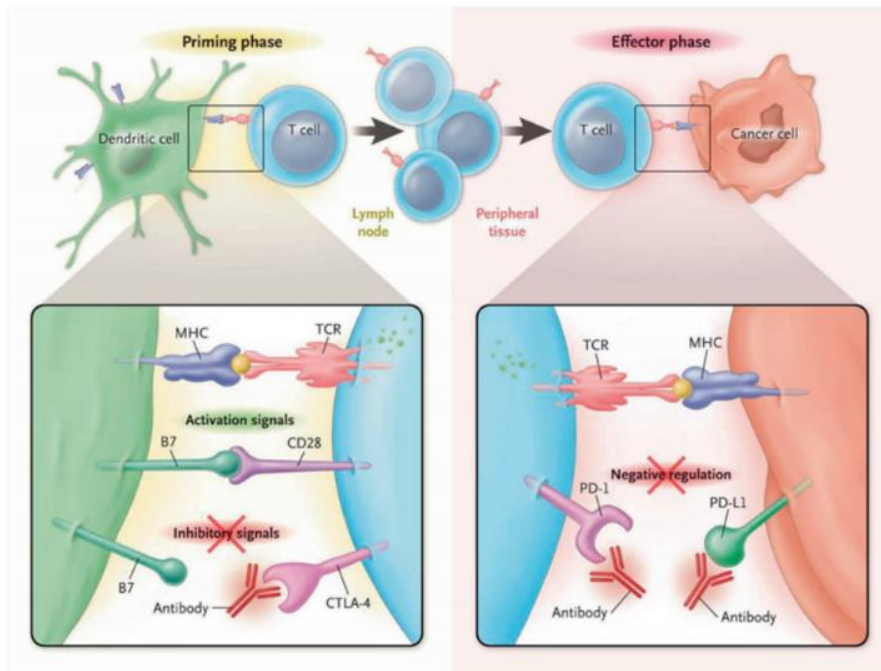


Figure 4 (d'après Caux et al.) - Différence entre le blocage CTLA-4/B7 et le blocage PD-1/PD-L1

PD-1 est une molécule inhibitrice présente à la surface des lymphocytes T, dont les ligands PD-L1 ou PD-L2 se trouvent au niveau de la cellule tumorale ou des cellules de l'infiltrat immunitaire. La liaison du couple PD-L1/L2 ~ PD-1 entraîne entre autres la phosphorylation du domaine intra-cytoplasmique du PD-1 qui va ensuite recruter SHP2 et SHP1, induire l'inhibition de la signalisation proximale du TCR et de ce fait limiter l'activation et l'expansion des LT. La voie du PD-1 inhibe ainsi la réponse T effectrice au niveau du site tumoral. (Figure 4)

- **Thérapeutiques anti-CTLA-4 et anti-PD-1**

Le blocage de ces deux points de contrôle de l'immunité a ainsi comme objectif, en réalisant l'inhibition d'un signal inhibiteur, de restaurer l'action du système immunitaire contre la tumeur. Les thérapeutiques développées dans le traitement du mélanome sont l'ipilimumab

et le tremelimumab (anticorps monoclonaux anti-CTLA-4), le nivolumab et le pembrolizumab (anticorps monoclonaux anti-PD-1) et l'atezolizumab (anticorps anti-PD-L1). (Figure 4)

Ainsi, les dernières recommandations de l'Institut National du Cancer (INCA) publiées en 2017 placent les anticorps monoclonaux anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) en traitement de première ligne pour les patients non porteurs de la mutation BRAF V600 et les anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab) en traitement de seconde ligne. Les associations d'immunothérapie (nivolumab et ipilimumab) ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) du fait d'une efficacité supérieure mais sont associées à des effets secondaires importants, ce qui pourrait en limiter l'utilisation à un sous-groupe de patients répondant à certains critères (statut OMS 0 ou 1, absence de co-morbidités, absence de métastases leptoméningées ou cérébrales non contrôlées). De plus, des discussions sont en cours au niveau des instances nationales afin de maintenir l'accès à l'ipilimumab et sa prise en charge financière en monothérapie ou en combinaison.

Concernant les patients porteurs de la mutation BRAF V600, les recommandations reposent sur l'association d'une molécule anti-BRAF et d'une molécule anti-MEK pour le traitement de première ligne, hormis chez les patients avec une maladie à évolution lente et une masse tumorale limitée où l'utilisation des anti-PD-1 en première ligne peut être discutée (2). (Annexe 1)

- ***Biomarqueurs prédictifs***

Depuis l'avènement de l'immunothérapie et afin de mieux guider la stratégie thérapeutique, de nombreuses études ont cherché à définir des biomarqueurs prédictifs de réponse. Plusieurs voies de recherche ont été développées, s'intéressant au microenvironnement

tumoral, à la tumeur elle-même, à l'infiltrat immunitaire mais également au sang périphérique (17). (Figure 5)

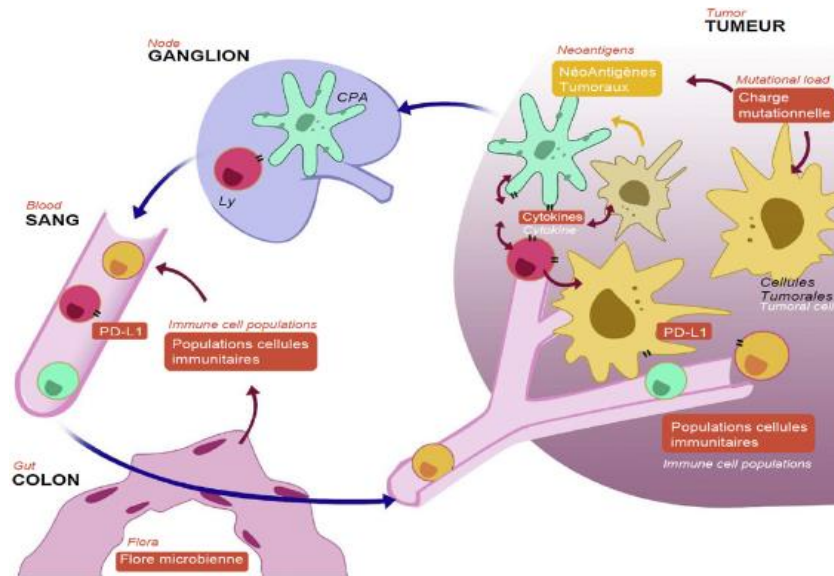


Figure 5 (d'après Frelau et al.) - Les éléments clés du développement de biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie. La tumeur elle-même, son microenvironnement et le système immunitaire de l'hôte doivent être considérés ensemble pour le développement de biomarqueurs.

Les principaux travaux réalisés ces dernières années se sont intéressés à l'analyse du tissu tumoral. L'étude de l'expression sur les cellules cancéreuses et sur les cellules de l'infiltrat immunitaire de PD-L1 et PD-1 par immunohistochimie a suscité un notable intérêt de recherche. Une étude princeps en 2012 met en évidence un plus haut niveau de réponse objective aux anti-PD-1 chez les patients présentant un statut PD-L1 positif sur la tumeur (défini par un taux supérieur ou égal à 5% de cellules exprimant PD-L1), dans plusieurs types de cancers, comparé aux patients au statut PD-L1 négatif (18).

Par la suite, plusieurs études ont montré des résultats contradictoires, illustrant la complexité de définir l'expression de PD-L1 comme biomarqueur prédictif de réponse. En effet, cette analyse se confronte à plusieurs difficultés liées à l'absence de standardisation de l'anticorps utilisé pour la détection de PD-L1, au manque d'uniformité du type cellulaire

ciblé (cellule cancéreuse ou cellule du microenvironnement) et aux différentes valeurs seuils de positivité retenues pour l'expression de PD-L1. L'hétérogénéité de l'expression de PD-L1 est également à prendre en compte : il s'agit d'une variable dynamique dans le temps, dont l'expression peut différer dans un même site tumoral mais également entre site primaire tumoral et sites métastatiques (19).

Concernant les patients atteints de mélanome métastatique, bien que les résultats tendent à démontrer que l'expression de PD-L1 est prédictive d'une meilleure réponse à l'immunothérapie (20–22), certains patients pour qui l'expression de PD-L1 n'est pas retrouvée pourraient également en tirer bénéfice, plus particulièrement en cas d'association d'immunothérapie (ipilimumab et nivolumab), comme constaté dans l'étude de Larkin et al. en 2015 (23).

Notons qu'en revanche, pour d'autres cancers, et en particulier le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), le statut PD-L1 est partie intégrante de la stratégie thérapeutique, puisque la Food and Drug Administration (FDA), puis la Haute Autorité de Santé (HAS) placent le pembrolizumab en première ligne chez les patients atteints de CBNPC métastatiques avec expression de PD-L1 supérieure ou égale à 50 %, sur les résultats d'une étude de phase III (24–26).

Ainsi, les données actuelles pour le mélanome métastatique ne nous permettent pas d'inclure le statut PD-L1 à lui seul dans la stratégie thérapeutique, mais l'espoir est de pouvoir l'intégrer dans un biomarqueur multiparamétrique.

Dans cet objectif, plusieurs études se sont intéressées au micro-environnement tumoral et plus particulièrement à l'infiltrat lymphocytaire. On sait depuis les années 1980 que la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) est corrélée à un meilleur pronostic et

ceci dans de nombreux cancers solides (8). Plus précisément, un haut niveau d'infiltration par les LT CD8⁺ PD-L1⁺ reflèterait une meilleure réponse clinique et une augmentation du nombre de ces cellules dans l'infiltrat tumoral pendant le traitement est retrouvée chez les patients répondeurs (20–22,27,28).

Venant confirmer ces données, l'étude de Daud et al. retrouve dans un groupe de patients atteints de mélanome métastatique, une corrélation entre une meilleure réponse à l'immunothérapie et un plus fort taux de LT CD8⁺ CTLA-4⁺ PD1⁺ sur des biopsies avant traitement (27).

Néanmoins, ces méthodes sont confrontées à diverses limites parmi lesquelles la nécessité de posséder du matériel tissulaire en quantité suffisante, l'hétérogénéité du matériel tissulaire chez un même patient en fonction du site biopsié ainsi que le nombre limité de paramètres pouvant être étudiés (17).

D'autres travaux se sont intéressés à la charge mutationnelle et à la présence de néo-antigènes. En effet, l'ADN des cellules tumorales du mélanome possède un niveau élevé de charge mutationnelle. Ces mutations génèrent la formation de néo-antigènes, potentiellement reconnus par le système immunitaire comme étrangers à l'hôte. Ces néo-antigènes seraient à l'origine de l'activation des LT et seraient ainsi corrélés à une meilleure réponse à l'immunothérapie (29,30). Cette situation paraît plus avérée encore en cas d'instabilités micro-satellitaires, qui sont inversement corrélées à une meilleure capacité de réparation de l'ADN (31). A ce jour, ces données sont prometteuses mais restent confrontées à des difficultés techniques, les méthodes de séquençage du génome étant complexes et coûteuses.

Concernant le profil immunologique sanguin des patients pendant le traitement par immunothérapie, très peu d'études sont retrouvées dans la littérature, et jusqu'à peu, aucune d'entre elles n'avait réussi à identifier un marqueur de réponse au traitement.

Huang et al. en 2017 ont exploré le sang périphérique des patients atteints de mélanome métastatique traités par immunothérapie, avant et après 12 semaines de traitement, comparés à un groupe contrôle. L'étude met en évidence chez les patients une sous-population de LT CD8⁺ PD-1⁺ non fonctionnels, cible des anti-PD-1, capable de se réactiver suite à l'immunothérapie (32).

De façon très récente, Krieg et al. ont décrit qu'un haut niveau de monocytes CD14⁺CD16⁻HLADR^{hi} avant le début du traitement serait un facteur prédictif de survie sans récurrence et de survie globale, chez une population de vingt patients atteints de mélanome métastatique, comparée à des donneurs sains (33). Il s'agissait cependant d'une étude sur une faible cohorte et réalisée à partir de l'analyse de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) décongelées.

Du fait d'une accessibilité aisée et d'une méthode relativement peu invasive, étudier le sang périphérique des patients semble être une stratégie attractive afin de développer des biomarqueurs prédictifs de réponse à l'immunothérapie. L'intégration de ces biomarqueurs dans la stratégie thérapeutique pourra guider le clinicien dans le choix des différentes molécules afin de limiter les effets indésirables mais surtout d'augmenter le taux de réponse au traitement en améliorant la compréhension des mécanismes de résistance.

- ***Notre étude***

Dans cet objectif, nous avons réalisé dans cette étude un immunomonitoring phénotypique et fonctionnel par cytométrie en flux des diverses sous-populations immunitaires du sang périphérique de patients atteints de mélanome stade IV, avant puis après le début du traitement par immunothérapie. Nous faisons l'hypothèse que l'état du système immunitaire lors des premières étapes de traitement est susceptible de représenter un possible biomarqueur prédictif de réponse à l'immunothérapie.

MATERIEL ET METHODES

▪ *Patients*

Dix-neuf patients atteints de mélanome métastatique stade IV traités au CHU de Grenoble dans le service de dermatologie ont été inclus dans l'étude, entre décembre 2015 et septembre 2017. Notre cohorte comportait onze hommes et huit femmes, l'âge médian était de 67 ans et 5 mois. (Tableau 1)

Six patients avaient reçu un traitement par anti-BRAF seul ou une association anti-BRAF et anti-MEK antérieure au traitement par immunothérapie, tandis que pour les treize autres patients l'immunothérapie était la première ligne de traitement.

Onze patients étaient traités par pembrolizumab à la posologie de 2 milligrammes par kilogrammes (mg/kg) toutes les 3 semaines, six patients étaient traités par nivolumab à 3 mg/kg toutes les 2 semaines, deux patients étaient traités par l'association nivolumab (1 mg/kg toutes les 3 semaines) combiné à l'ipilimumab (3 mg/kg toutes les 3 semaines) pendant 4 cures puis en relai par nivolumab 3 mg/kg toutes les 2 semaines.

Deux prélèvements de sang périphérique sur tubes héparinés ont été réalisés pour chaque patient : un premier prélèvement (P1) avant l'immunothérapie et un deuxième prélèvement (P2) entre la deuxième et la sixième semaine après la première cure. Ces prélèvements étaient acheminés au laboratoire du service recherche et développement pour être traités le jour même ou au plus tard dans les vingt-quatre heures après le prélèvement.

L'évaluation des patients était réalisée à trois mois puis à six mois après le début du traitement et a permis de classer les patients en deux groupes par rapport à la réponse à six mois : dix patients répondeurs et neuf patients non répondeurs.

Le groupe « répondeur » correspondait au groupe de patients n'ayant pas présenté de signes de progression clinique ou scannographique. L'évaluation scannographique était réalisée selon les critères du Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) : une réponse complète (RC), une réponse partielle (RP) ou une stabilité de la maladie (SD) plaçaient le patient dans le groupe répondeur. La RC était définie comme la disparition de toutes les lésions cibles et une dimension inférieure à 10 mm de petit axe pour tous les ganglions. La RP était définie comme la diminution d'au moins 30 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la somme initiale des diamètres (34).

Le groupe « non répondeur » correspondait au groupe de patients ayant présenté une progression clinique ou scannographique selon les critères RECIST (PD), ou un décès lié à la maladie en cours de traitement. Les critères scannographiques correspondaient à une augmentation supérieure ou égale à 20 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la plus petite somme des diamètres observée durant l'étude. L'apparition d'une ou plusieurs nouvelles lésions était également considérée comme progression.

Le suivi de la réponse à six mois nous a permis de confirmer le profil de réponse pour chaque patient et d'éliminer les pseudo-progressions possiblement visibles à l'évaluation scannographique des trois mois.

Tous les patients ont donné leur consentement oral et écrit après information claire loyale et appropriée, avant le début de l'étude.

Patients	Sexe	Âge	Traitement	Réponse	Traitement antérieur
16MEL040	Masculin	64	pembrolizumab	Non répondeur	Non
16MEL041	Féminin	78	pembrolizumab	Non répondeur	Non
16MEL047	Masculin	61	pembrolizumab	Répondeur	Oui
16MEL049	Féminin	86	pembrolizumab	Répondeur	Non
16MEL050	Masculin	66	pembrolizumab	Non répondeur	Oui
16MEL051	Féminin	33	nivolumab	Répondeur	Oui
16MEL052	Masculin	68	pembrolizumab	Répondeur	Non
16MEL055	Masculin	61	nivolumab-ipilimumab	Répondeur	Non
16MEL056	Masculin	71	nivolumab	Répondeur	Non
16MEL058	Masculin	78	nivolumab-ipilimumab	Répondeur	Non
16MEL059	Masculin	83	nivolumab	Répondeur	Non
16MEL060	Féminin	65	nivolumab	Non répondeur	Non
17MEL061	Féminin	74	pembrolizumab	Non répondeur	Non
17MEL062	Féminin	73	pembrolizumab	Non répondeur	Oui
17MEL064	Féminin	57	pembrolizumab	Non répondeur	Oui
17MEL066	Masculin	53	pembrolizumab	Non répondeur	Oui
17MEL070	Masculin	65	nivolumab	Non répondeur	Non
17MEL110	Féminin	85	nivolumab	Répondeur	Non
17MEL125	Masculin	61	pembrolizumab	Répondeur	non

Tableau 1 - Cohorte de patients

▪ ***Phénotypage du sang total***

Quatre tubes contenant 100 µL de sang total ont été incubés avec 50 µL de l'un des 4 mix d'anticorps (DC pour les sous-populations de cellules dendritiques ; T pour les sous-populations LT ; MBNK pour les sous-populations de Monocytes, LB et NK ; Mel Suivi pour les LT et molécules clés dans le traitement) pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante (TA). Au bout de 30 minutes, ajout de 2 mL de FACS lysing (BD) dans chaque tube pour la lyse des hématies puis incubation 10 minutes à l'obscurité à TA. Après 10 minutes, lavage avec du PBS (Gibco, Life Technologie) puis centrifugation 5 minutes à 600g. Elimination du surnageant et reprise du culot dans 500 µL de PBS. Avant passage en cytométrie en flux (FACS Canto II, BD Biosciences), 15µL de bille « count bright » (Life Technologie) ont été ajoutées pour la quantification cellulaire. L'analyse des résultats a été faite sous le logiciel FlowJo.

Fluorochrome	Tube Mel suivi	Tube DC	Tube T	Tube MBNK
FITC	CD4	Lin	CD4	CD5
PE	4-1BB (CD137)	CD141	CRTH2	CD16
PerCP-Cy5,5	OX40 (CD134)	CD123	CD8	CD56
PE-Cy7	CD3	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR
APC	CD8	CD40	CD25	CD14
APC-H7	CD45	CD45	CD45	CD45
BV421	ICOS (CD278)	CD11c	CD127	CD66b
BV510	CD56	CD86	CD3	CD19

Tableau 2 - Mix d'anticorps utilisés pour les tubes DC, T, MBNK et Mel suivi

Ces marquages ont permis de définir une trentaine de sous-populations et leur état de différenciation et/ou d'activation par la mesure d'expression des marqueurs de surface recherchés : par exemple CD40 et CD86 chez les DC ; CD25, CD127, CD134, CD137 et CD278 chez les LT ; CD16 et CD66b pour les cellules myéloïdes et HLA-DR pour l'ensemble des cellules. (Tableau 2)

- **Activation des cellules sur sang total**

Trois tubes contenant 100µL de sang total ont été incubés avec 100µL de milieu contenant soit du R848 (5µg/mL), agoniste du ligand du récepteur TLR7/8, soit de la phytohémagglutinine A (PHA) (10µg/mL) soit du milieu de contrôle (RPMI-SVF 10%), à l'étuve 37°C - 5% CO₂ pendant 24 heures. Le R848 permet l'activation des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes. La PHA permet la stimulation et l'activation des lymphocytes T.

Deux fois 25µL de surnageant ont été collectés après 24 heures de culture puis congelés. Les cytokines IL-10, IL-12, IL-17, IL-2, IL-21, IFN-γ, TNF-α, IL-13, IL-9, IL-1β et IL-4 ont été quantifiées par Cytometric Beads Array (CBA).

▪ **Isolation et congélation du plasma et des cellules**

Dans un premier temps, des aliquots de plasma de 2 x 100 µL et 2 x 1 mL ont été récupérés après centrifugation du sang à 800g pendant 10 minutes. Les aliquots sont conservés à -80°C. Le reste du sang a été dilué avec du PBS dans un volume final de 30mL puis déposé sur 15 mL de Ficoll (Eurobio), puis centrifugé 30 minutes à 800g. Récupération de l'anneau de PBMC dans un autre tube puis lavage avec 12 mL de PBS froid (centrifugation 10 minutes à 400g à 4°C). Elimination du surnageant puis lavage du culot avec 10 mL de PBS froid pour l'élimination des plaquettes (centrifugation 10 minutes à 200g). Entre-temps 100 µL de suspension cellulaire ont été prélevés pour une numération cellulaire au PENTRA (automate). Elimination du surnageant et reprise du culot avec 0,5 mL de solution de RPMI-SVF 50% et 0,5 mL de solution de RPMI-SVF 25%-DMSO 20%. La suspension cellulaire a été déposée dans une ampoule de congélation puis conservée dans l'azote liquide à -196°C (après une descente lente en température). Ces échantillons congelés pourront servir pour des analyses ultérieures. Les différentes étapes sont résumées dans la Figure 6.

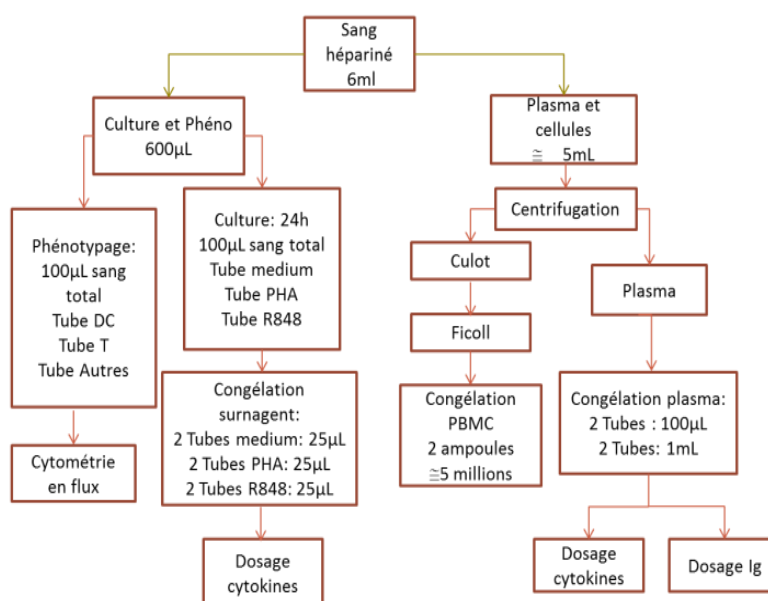


Figure 6 - Logigramme des analyses réalisées

▪ **Stratégie de gating sous FlowJo**

Les analyses des résultats ont été faites à partir des deux prélèvements : un premier prélèvement avant traitement (P1) et un deuxième prélèvement (P2) au début du traitement (2 à 6 semaines après la première cure). Les résultats sont analysés sous FlowJo où des stratégies de gating ont été mises au point pour chaque tube : DC, T, MBNK et Mel Suivi (Figure 7, Annexe 2). Toutes les stratégies de gating ont été validées par une deuxième personne.

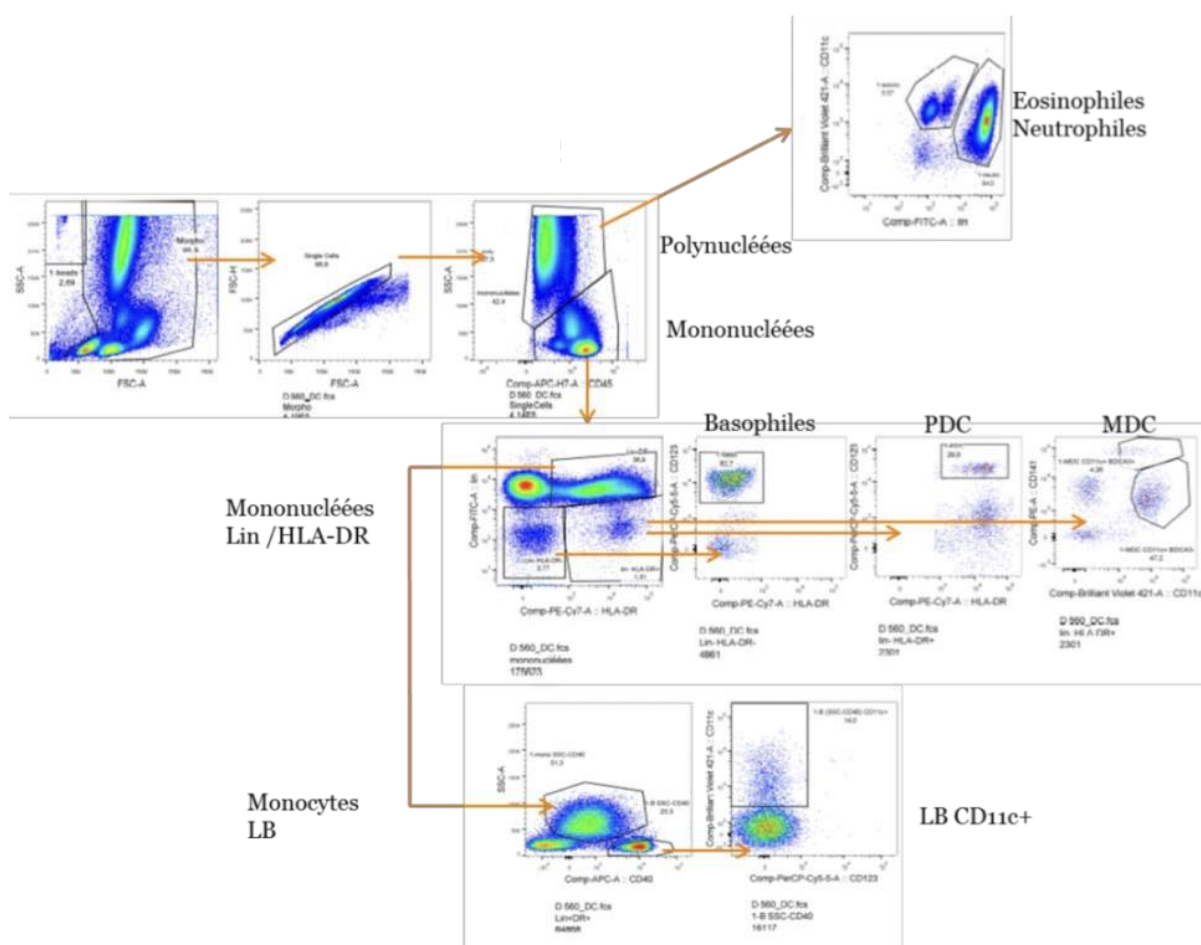


Figure 7 - Stratégie de gating pour le tube DC

▪ *Analyses statistiques des données*

Les tableaux de données ont été générés sous Excel après le gating manuel des différentes sous-populations des quatre tubes sous FlowJo. Les valeurs aberrantes ont été recherchées et analysées pour valider leur maintien ou élimination, par exemple si un problème technique était détecté. Les analyses statistiques ont été effectuées sous le logiciel Rstudio en utilisant un test de corrélation de spearman afin de rechercher une corrélation entre deux variables, test significatif si p-value < 0.001 (***), p-value < 0,01 (**) et p-value < 0,05 (*). Pour les tests de comparaisons des patients répondeurs et des non répondeurs, un test statistique de Student était réalisé (paramétrique, variances égales), de Welch (paramétrique, variances non égales) ou de Wilcoxon (non paramétrique), tests significatifs si $p < 0,05$ après une analyse d'une distribution normale des résultats par un test de Shapiro avec p-value > 0,07 (Annexe 3). Certaines analyses ont été faites sous Graphpad Prism.

RESULTATS

Dans ce travail, nous avons cherché à identifier des biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement par immunothérapie, en recherchant une différence significative entre les patients répondeurs et les patients non répondeurs sur les différentes sous-populations des cellules du système immunitaire retrouvées dans le sang périphérique, avant traitement (P1) et après le début du traitement (P2).

Les principales populations cellulaires étudiées dans ce rapport sont les cellules mononuclées qui comprennent les cellules dendritiques myéloïdes (mDC), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), les NK, les monocytes, les LB et les différentes sous-populations de LT (T reg, LT CD4⁺, LT CD8⁺). Nous avons également analysé les polynucléaires qui comprennent les éosinophiles, les neutrophiles et les basophiles. Les basophiles ont une taille et une granularité qui les placent en cytométrie en flux dans la fenêtre des cellules mononuclées. Les différents types cellulaires ont été identifiés à l'aide de fenêtres définies sur la base de l'expression de marqueurs spécifiques de chaque sous-population. Leurs fréquences, numérations (cellule/ μ L) et MFI (intensité moyenne de fluorescence) pour différents marqueurs ont été analysées.

Nous avons ainsi réalisé, au P1 et P2 et pour chaque sous-populations de cellules, différents tests statistiques de comparaisons entre les deux groupes de patients afin de rechercher une corrélation entre les fréquences ou les numérations et la réponse au traitement. Lorsqu'un résultat significatif sur une sous-population était retrouvé, nous avons ensuite analysé sa variation au cours du temps entre les deux prélèvements ainsi que le niveau d'activation de la cellule, en explorant les MFI pour différents marqueurs.

Enfin, nous avons étudié la production de cytokines par l'ensemble des cellules après activation in vitro par PHA et R848 afin de rechercher une différence entre les patients répondeurs et les non répondeurs, avant puis après le début du traitement.

L'analyse complète des résultats des analyses statistiques sur différentes sous-populations est présentée dans le tableau en Annexe 4. L'analyse complète des résultats de la production des différentes cytokines est présentée dans le tableau en Annexe 5 après stimulation en PHA et en Annexe 6 après stimulation au R848. Nous détaillerons ici uniquement les principaux résultats significatifs, résumés dans le Tableau 3, ainsi que les données non significatives mais néanmoins analysées en détail suite aux travaux de Krieg et al.

Populations	Prélèvement	Paramètres	Test statistiques	p-values	Significatif ?	Tendance
LT CD4 ⁺	P1	Numération (cellule/μL)	Two sample t-test	0,04653	Oui	R >NR
		Fréquence (% MNC)	Wilcoxon test	0,03898	Oui	R >NR
	P2	Numération (cellule/μL)	Welch two sample t-test	0,08565	Non	R >NR
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,04888	Oui	R >NR
Treg	P1	Numération (cellule/μL)	Two sample t-test	0,06781	Non	R >NR
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,04318	Oui	R >NR
	P2	Numération (cellule/μL)	Wilcoxon test	0,1079	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Welch two sample t-test	0,01247	Oui	R >NR
mDC BDCA3 ⁻	P1	Numération (cellule/μL)	Two sample t-test	0,2213	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Wilcoxon test	0,4363	Non	/
	P2	Numération (cellule/μL)	Wilcoxon test	0,6806	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,003561	Oui	NR > R
Monocytes	P1	Numération (cellule/μL)	Two sample t-test	0,05685	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,8399	Non	/
	P2	Numération (cellule/μL)	Two sample t-test	0,2076	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Welch two sample t-test	0,9583	Non	/

Tableau 3 - Analyses comparatives entre groupe répondeur et non répondeur au premier et deuxième prélèvement

▪ *Lymphocytes T CD4⁺*

La fréquence des lymphocytes T CD4⁺ apparaît significativement plus élevée chez les patients répondeurs que chez les non répondeurs, avant traitement (p=0,03) et après le début du traitement (p=0,04) (Figure 8). La numération des lymphocytes T CD4⁺ apparaît également plus élevée chez les patients répondeurs avant traitement (p=0,04). (Tableau 3)

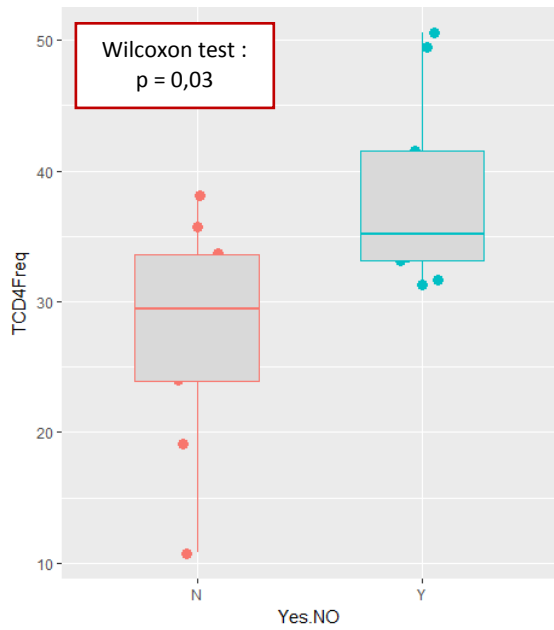


Figure 8a - Fréquence des LT CD4⁺ au P1

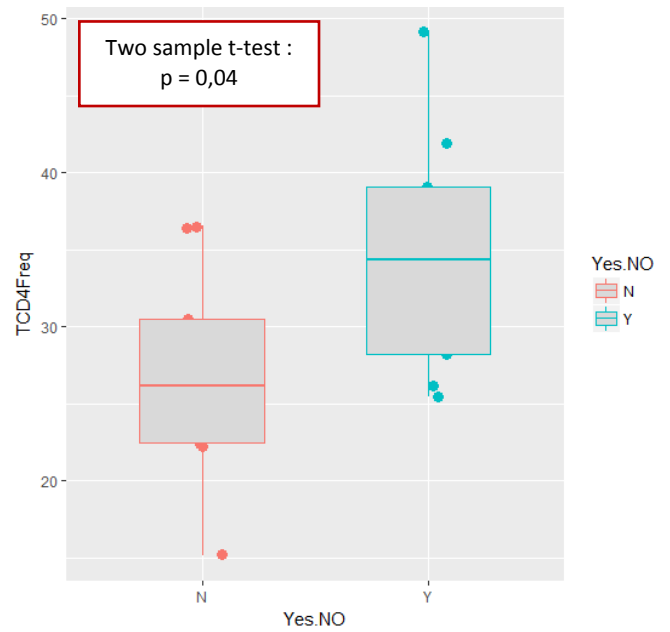


Figure 8b - Fréquence des LT CD4⁺ au P2

Nous avons analysé la variation de fréquence au cours du temps pour les LT CD4⁺ pour les patients répondeurs et non répondeurs. Nous remarquons que la fréquence des LT CD4⁺ diminue de façon significative entre les deux prélèvements chez les patients répondeurs uniquement (p=0,03). (Figure 9)

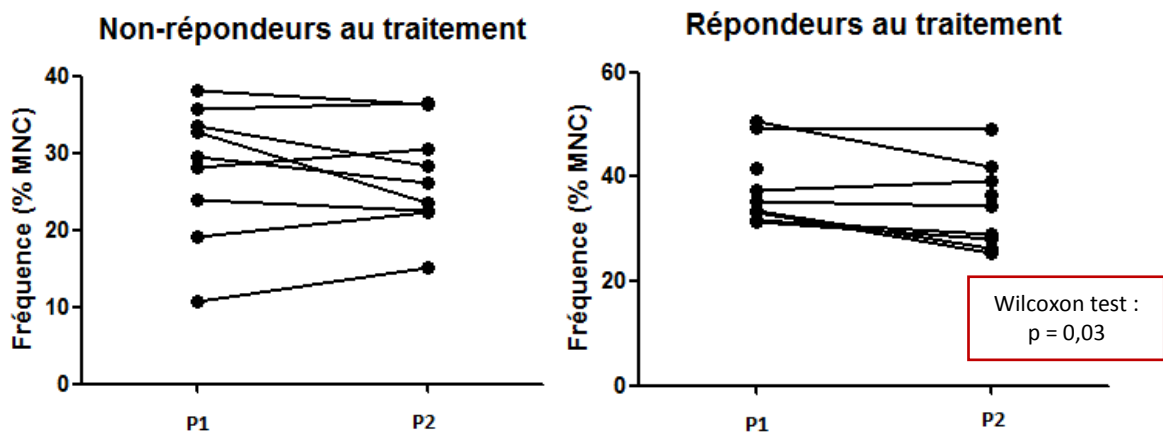


Figure 9 - Evolution des LT CD4⁺ au cours du temps pour les deux groupes

Afin de mieux caractériser cette sous-population LT CD4⁺ et de distinguer leur profil fonctionnel cytokinique nous avons recherché une corrélation entre la production après activation en PHA des différentes cytokines en pg/mL et la numération en LT CD4⁺. Nous pouvons observer qu'il existe une corrélation statistiquement significative pour l'IL-2 ($r=0,53^*$), l'IL-4 ($r=0,55^{**}$), l'IL-9 ($r=0,68^{***}$) et l'IL-13 ($r=0,65^{**}$) suggérant que ce sont bien les LT CD4⁺ qui produisent ces cytokines dans notre test (Figure 10). Nous ne retrouvons pas en revanche de telles corrélations pour les autres cytokines, en particulier l'IFN- γ et le TNF- α avec la numération en LT CD4⁺ (non montré).

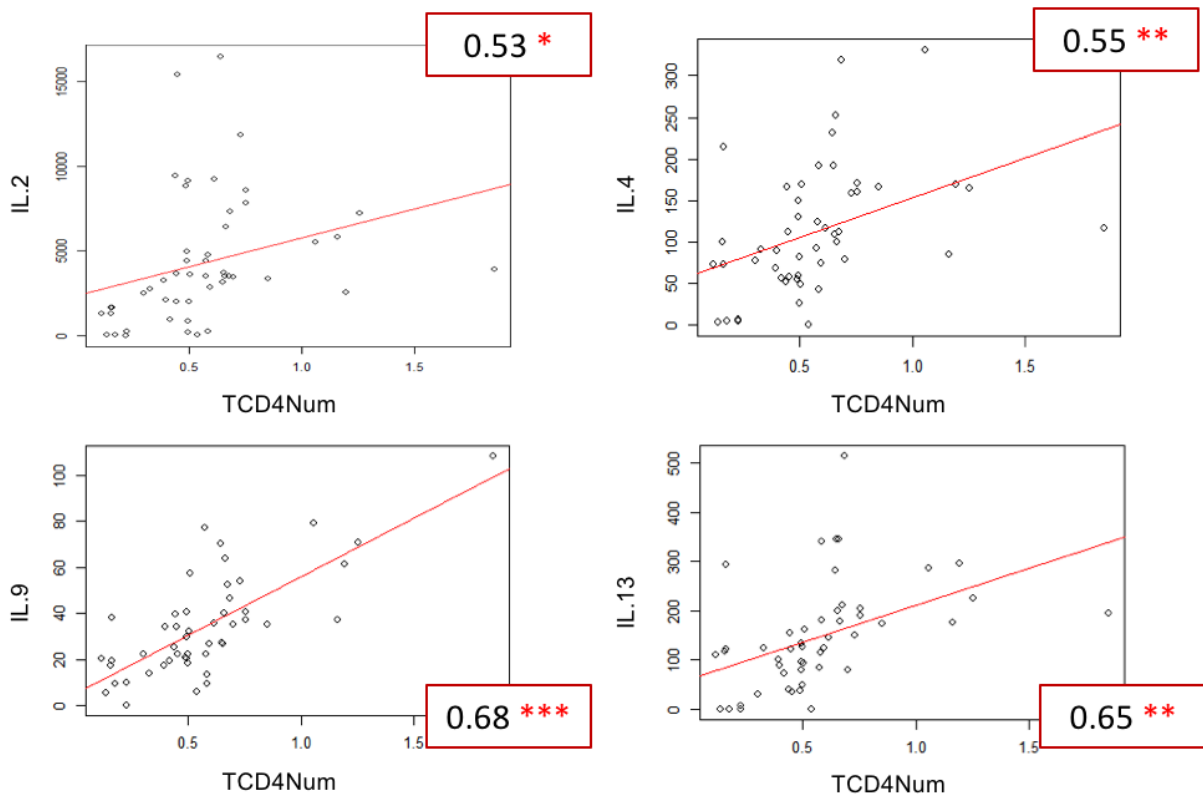


Figure 10 - Corrélation entre la numération de LT DC4+ (cell/mL) et les cytokines IL-2 ($p<0,05$), IL-4 ($p<0,01$), IL-9 ($p<0,001$) et IL-13 ($p<0,01$) (pg/mL) en stimulation PHA

Nous avons ensuite recherché une différence de production de ces cytokines après stimulation en PHA entre répondeurs et non répondeurs, avant et après le début du traitement. Nous observons qu'il existe une différence dans la production d'IL-4 qui apparaît

significativement plus importante chez les patients répondeurs que chez les non répondeurs après traitement ($p=0,009$) (Figure 11). De façon non significative mais apparente, la production d'IL-9 et d'IL-13 se révèle plus importante chez les répondeurs que chez les non répondeurs au deuxième prélèvement ($p=0,08$ et $p=0,07$ respectivement) (Figure 12 et Figure 13). Nous n'observons pas en revanche de différence significative dans la production d'IL-2 entre les deux groupes (Annexe 5).

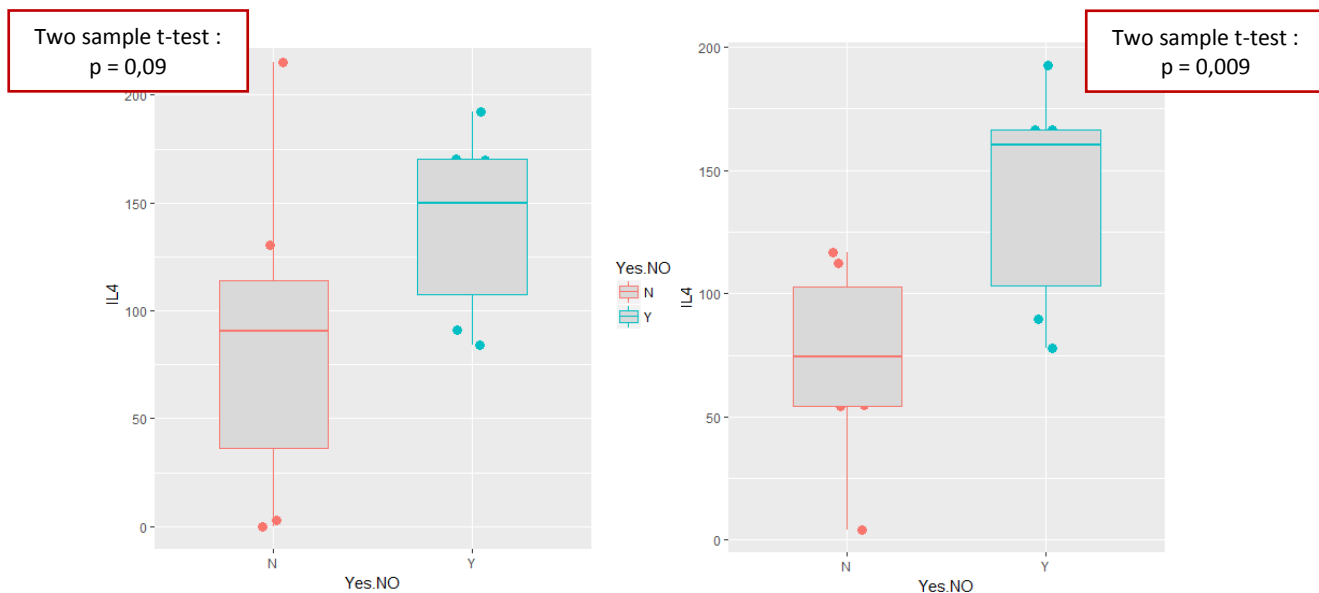


Figure 11 – Comparaison de la production d'IL-4 chez les répondeurs et non répondeurs au P1 (gauche) et au P2 (droite) en PHA

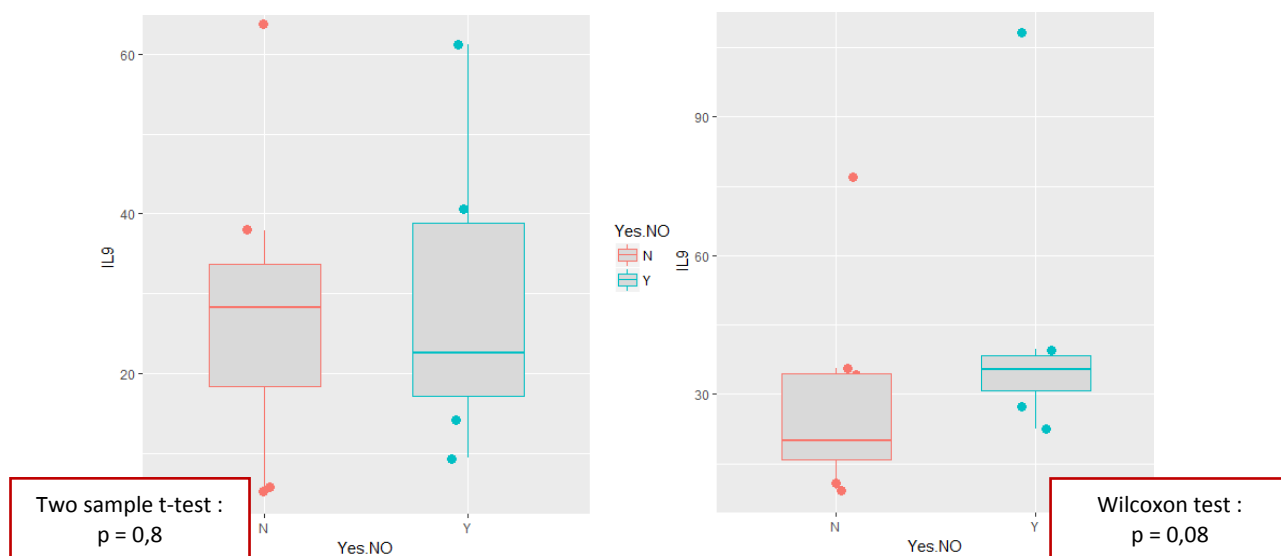


Figure 12 - Comparaison de la production d'IL-9 chez les répondeurs et non répondeurs au P1 (gauche) et au P2 (droite) en PHA

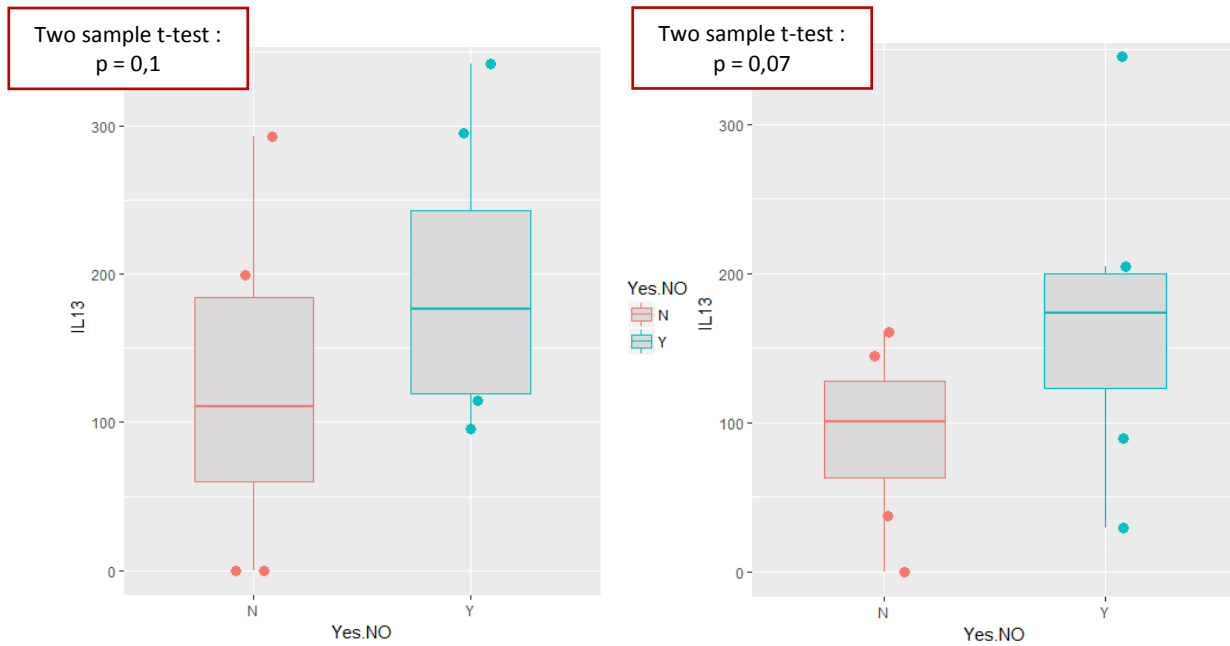


Figure 13 - Comparaison de la production d'IL-13 chez les répondeurs et non répondeurs au P1 (gauche) et au P2 (droite) en PHA

Dans notre stratégie d'analyse, il est possible d'identifier les LTh2 qui se caractérisent par l'expression à leur surface du marqueur CRTh2. Nous avons voulu regarder si la fréquence et la numération de ces cellules était différente entre répondeurs et non répondeurs. Nous retrouvons une numération plus élevée chez les patients répondeurs par rapport aux patients non répondeurs, de façon presque significative avant le traitement et de façon statistiquement significative après le traitement. (Figure 14)

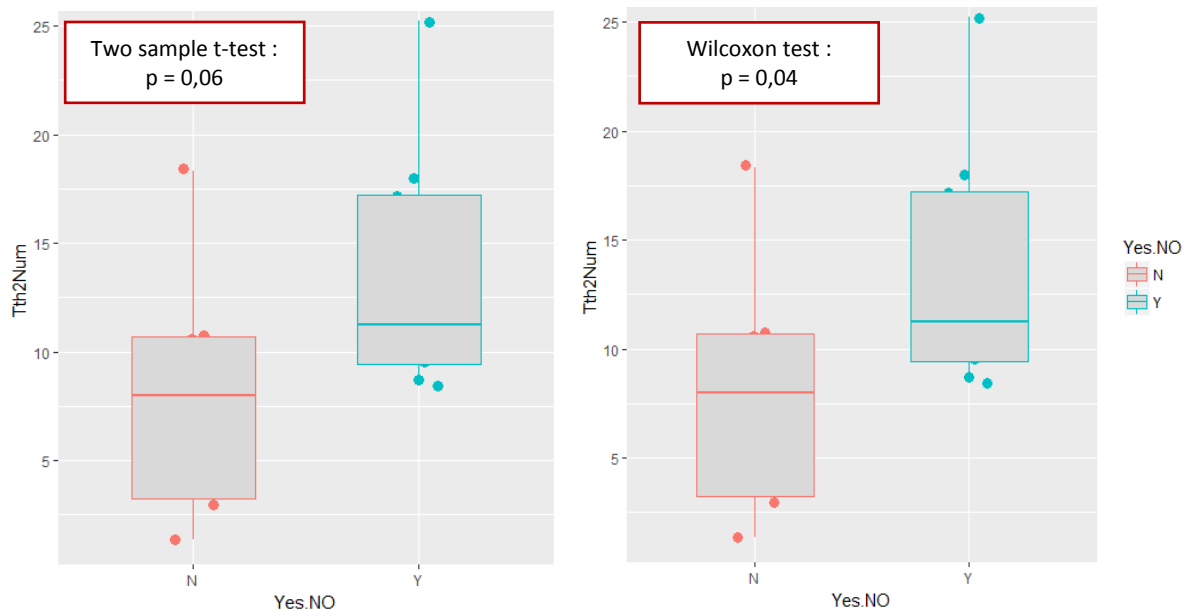


Figure 14 - Numération des LTh2 au P1 (à gauche) et au P2 (à droite)

Nos résultats retrouvent donc chez les patients répondeurs, une fréquence de LT CD4⁺ plus élevée que chez les patients non répondeurs avant et après le début du traitement, avec une légère diminution de cette fréquence au cours du temps uniquement chez les patients répondeurs. Parmi les LT CD4⁺, les LTh2 ont une numération augmentée chez les patients répondeurs. La population cellulaire des LT CD4⁺ est corrélée à la production après stimulation en PHA d'IL-4 et IL-13 mais également à la production d'IL-9 qui est produite par les LTh9. Enfin, après le début du traitement, les patients répondeurs ont une production plus importante que les patients non répondeurs des cytokines IL-4, IL-9 et IL-13 alors que cette différence n'est pas retrouvée avant le traitement par immunothérapie, suggérant une activation et un rôle antitumoral des LTh2 et des LTh9.

▪ *Lymphocytes T régulateurs*

Nous avons ensuite analysé de façon plus précise la population des LT CD4⁺ régulateurs. La fréquence des T reg apparaît significativement plus élevée chez les répondeurs que chez les

non répondeurs ($p=0,04$) avant le traitement (P1). Cette différence est retrouvée après le début du traitement (P2) où la fréquence des T reg est toujours significativement plus élevée chez les répondeurs que chez les non répondeurs ($p=0,01$) (Figure 15).

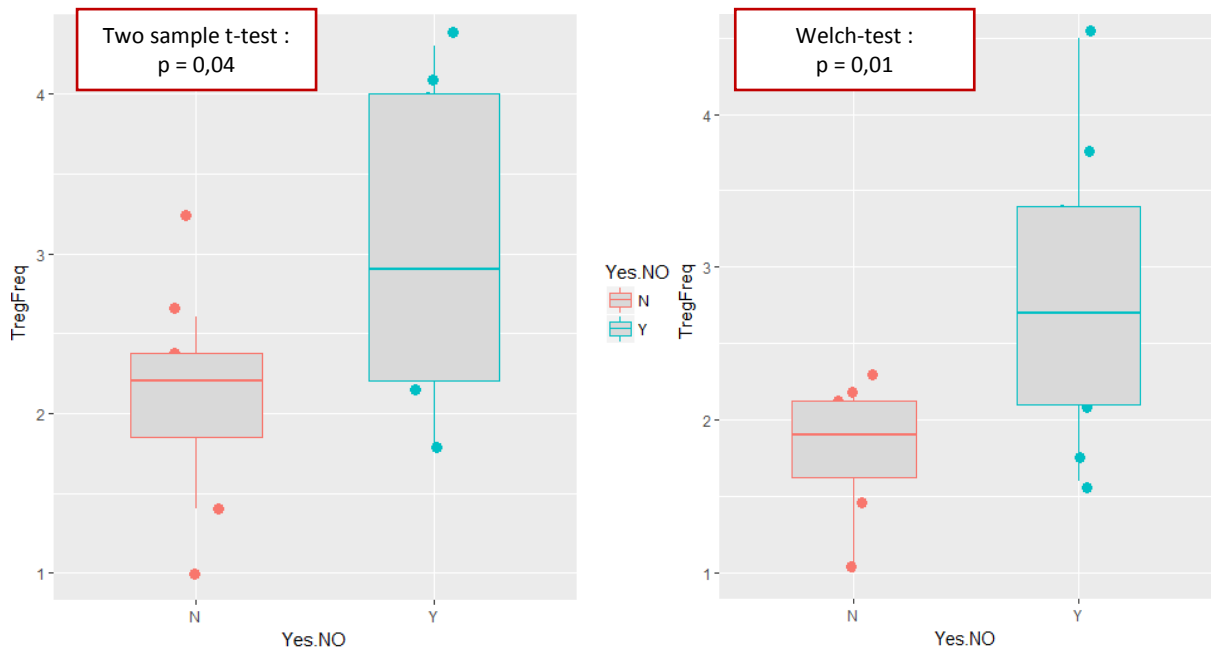


Figure 15 - Fréquence des T reg au P1 (à gauche) et au P2 (à droite)

Nous avons ensuite comparé l'évolution de la fréquence des T reg pour les répondeurs et les non répondeurs. Il n'y a pas de différence statistiquement significative de variation de leurs fréquences au cours du temps dans les deux groupes (Figure 16).

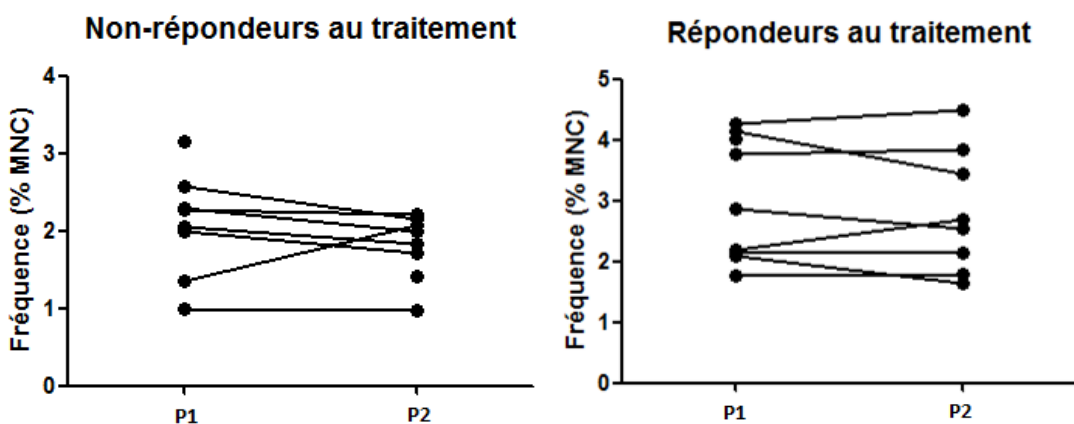


Figure 16 - Evolution des T reg au cours du temps pour les deux groupes

Afin d'évaluer la qualité des T reg et leur fonction immunosuppressive sur le micro-environnement tumoral une analyse de la production de la cytokine IL-10 a été réalisée. Il existe une corrélation statistiquement significative entre la fréquence des T reg (%MNC) et la concentration en IL-10 (pg/mL) ($r = 0,71$ ***) (Figure 17), suggérant que lors de l'activation en PHA la production d'IL-10 est liée à la sous-population T reg. De plus, nous observons que les répondeurs présentent une sécrétion plus importante d'IL-10 par rapport aux non répondeurs après stimulation en PHA, mais cette différence n'est pas significative. (Figure 18)

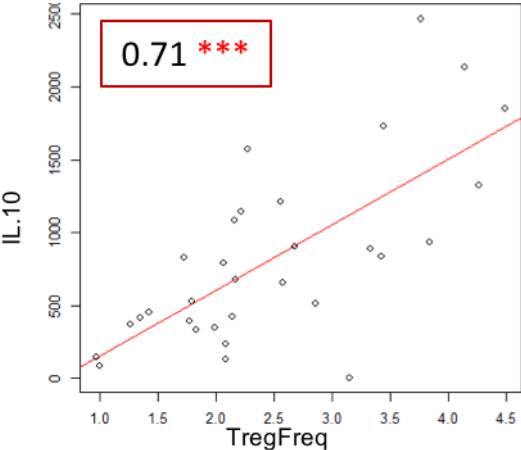


Figure 17 - Corrélation entre la fréquence des Treg (%MNC) et la concentration en IL-10 (pg/mL) en stimulation PHA

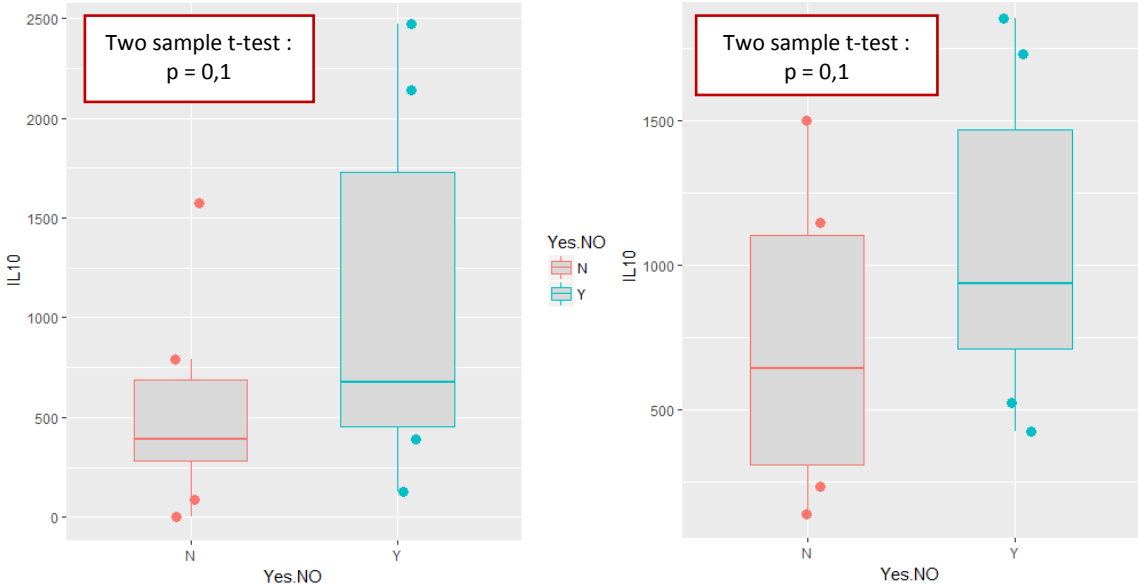


Figure 18 - Comparaison de la production d'IL-10 (pg/mL) après stimulation en PHA entre répondeurs et non répondeurs au P1 (à gauche) et P2 (à droite)

Nous pouvons donc mettre en évidence chez les patients répondeurs une sous-population de T reg que l'on retrouve avec une fréquence plus élevée que chez les non répondeurs avant et après le début du traitement, et qui est productrice d'IL-10. Cette cytokine immunosuppressive semble être produite en quantité plus importante chez les patients répondeurs, au P1 et au P2, sans que cette différence soit significative.

▪ **mDC BDCA3⁻**

La fréquence des mDC BDCA3⁻ apparaît significativement moins élevée chez les répondeurs que chez les non répondeurs ($p=0,003$) après le début du traitement (Figure 19). Cette différence n'est pas retrouvée avant le début du traitement. La fréquence des mDC BDCA3⁻ tend à diminuer chez les répondeurs au cours du temps alors que cette variation n'est pas retrouvée chez les patients non répondeurs ($p=0,05$) (Figure 20).

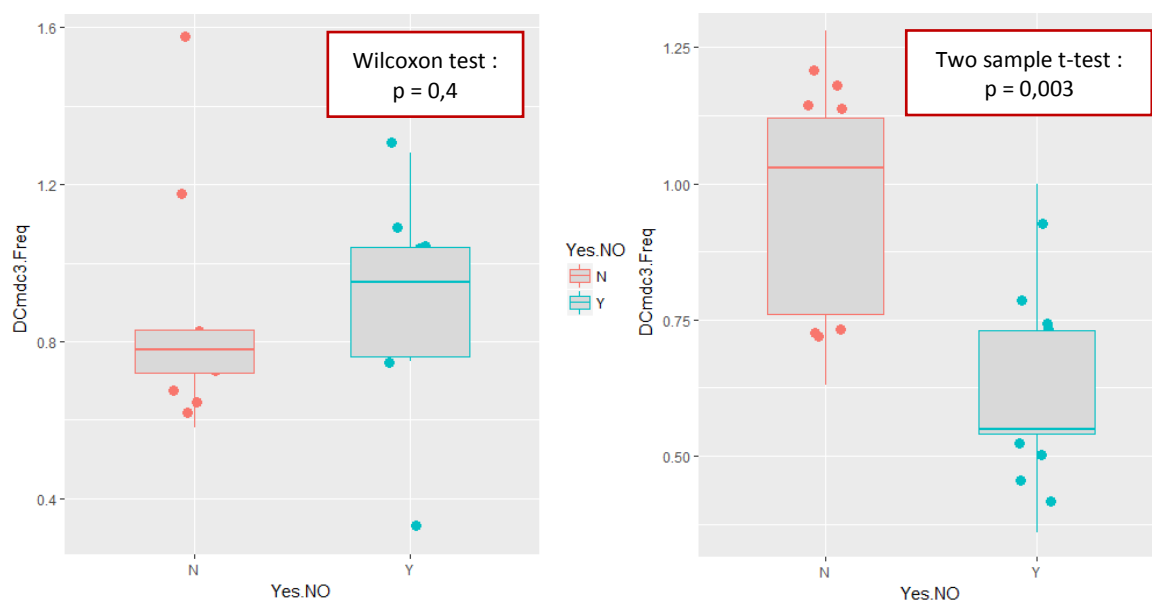


Figure 19 - Fréquence des mDC BDCA3⁻ au P1 (à gauche) et au P2 (à droite)

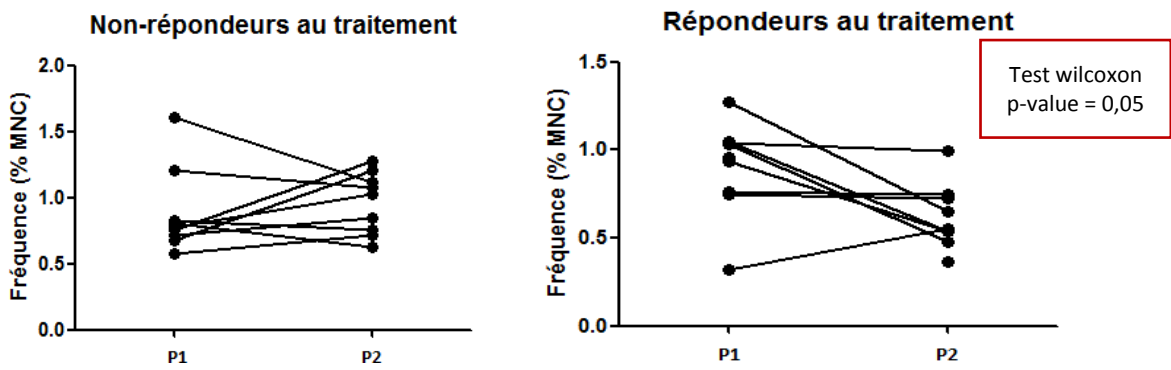


Figure 20 - Fréquence des mDC BDCA3⁺ au cours du temps dans les deux groupes

Nous avons alors recherché une différence dans le niveau d'expression des marqueurs d'activation et de maturation sur cette sous-population entre les deux groupes. On retrouve pour les mDC BDCA3⁺ une expression des marqueurs CD86, CD66b et CD16 significativement plus élevée chez les répondeurs que chez les non répondeurs avant traitement ($p=0,02$; $p=0,01$; $p=0,009$ respectivement) (Figure 21). Cette différence n'est pas retrouvée après traitement. Nous ne retrouvons pas de différence significative pour les marqueurs CD40 et HLA-DR (non montrés).

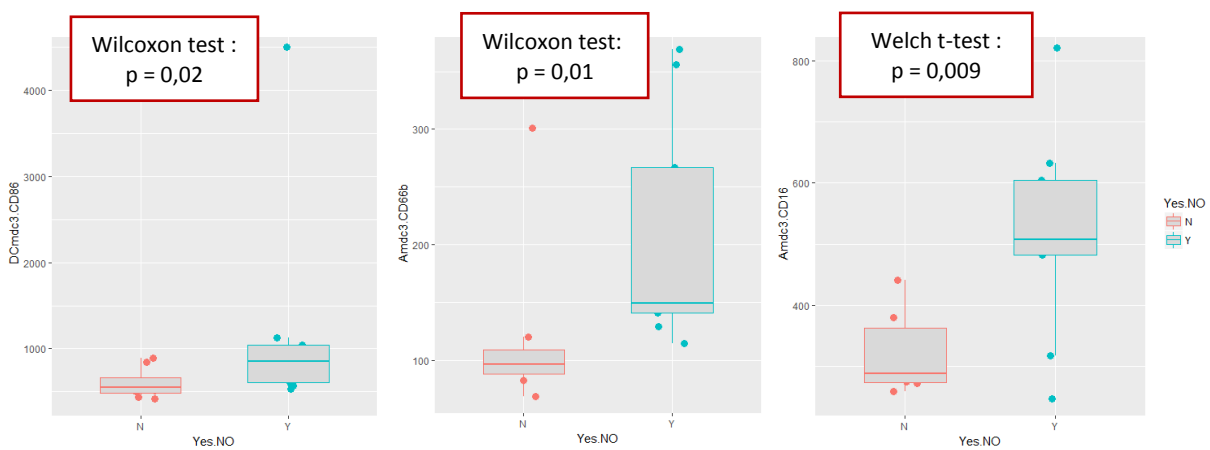


Figure 21 - Boxplots comparatifs entre répondeurs et non-répondeurs sur l'expression des marqueurs CD86, CD66b et CD16 (de gauche à droite) avant traitement

Nous voyons donc sur cette population une nette différence entre les patients répondeurs et non répondeurs. Les patients répondeurs présentent un profil d'activation de ces cellules plus important avant le traitement, avec une diminution de la fréquence de celles-ci après le

début du traitement. Les mDC BDCA3⁻ pourraient donc jouer un rôle important dans la réponse antitumorale. En revanche, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre la fréquence, la numération et la sécrétion d'IL12p70 sous R848, cytokine décrite comme étant produite majoritairement par les mDC.

▪ *Monocytes*

Du fait de la publication récente de Krieg et al. proposant qu'un haut niveau de monocytes CD14⁺CD16⁻HLADR^{hi} avant le début du traitement pourrait être un facteur prédictif de réponse au traitement par immunothérapie nous sommes également intéressées à cette sous-population.

Dans notre étude, nous ne retrouvons pas de différence significative dans la fréquence des monocytes dit classiques CD14⁺CD16⁻ entre répondeurs et non répondeurs, avant ou après initiation du traitement. (Figure 22) (Annexe 4)

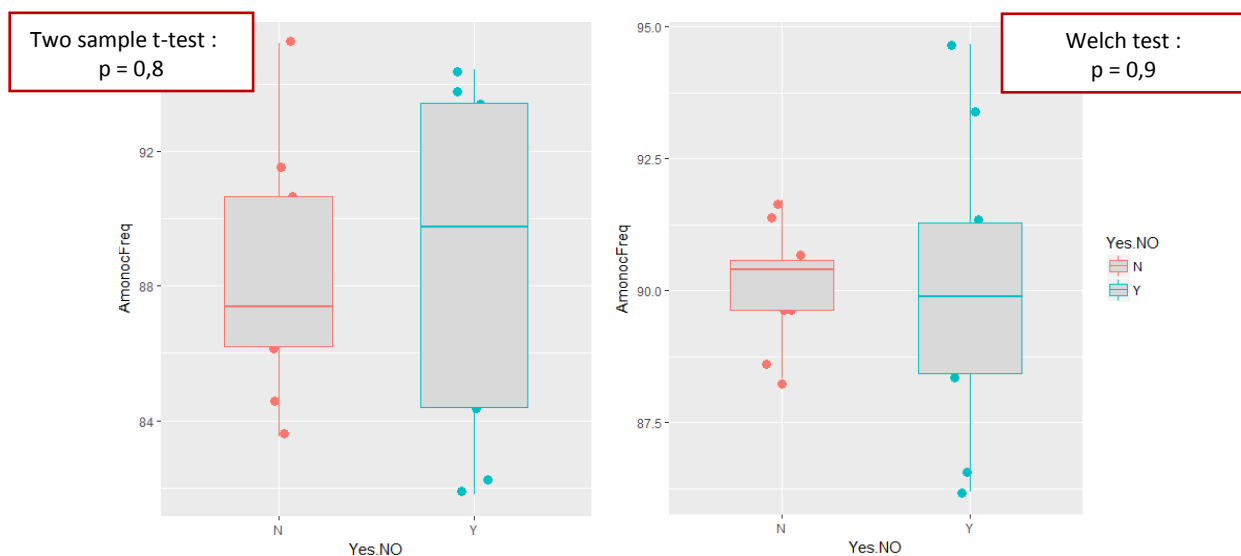


Figure 22 - Comparaison de la fréquence des monocytes CD14⁺ CD16⁻ entre répondeur et non répondeur, au P1 (à gauche) et au P2 (à droite)

Nous avons cependant cherché à définir le niveau d'activation de ces cellules en analysant les différents marqueurs présents à leur surface. Les patients répondeurs présentent une expression significativement plus élevée des marqueurs CD86 ($p=0,009$), CD66b ($p=0,01$), CRTH2 ($p=0,02$) et CD127 ($p=0,02$) avant traitement (Figure 23). Après le début du traitement, il n'existe plus de différence significative pour CD86, CRTH2 et CD127. L'expression de CD66b reste en revanche significativement plus élevée chez les patients répondeurs que chez les non répondeurs au P2 ($p=0,03$) (non montré).

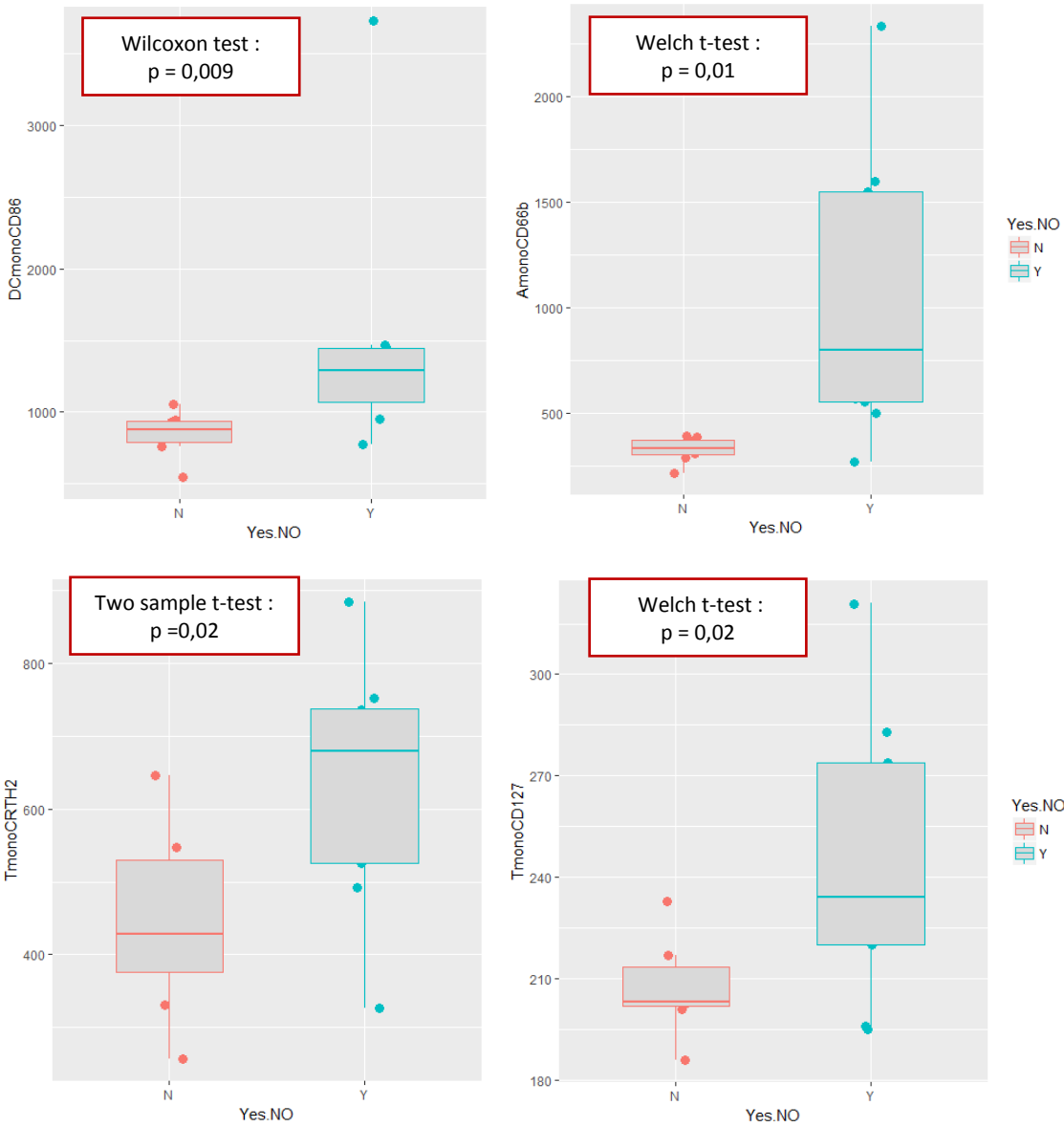


Figure 23 - Boxplots comparatifs entre patients répondeurs et non répondeurs de l'expression des marqueurs CD86, CD66b, CRTH2 et CD127 (de haut en bas et de gauche à droite) avant traitement

Nous voyons donc ici que la sous-population des monocytes dits classiques, CD14⁺CD16⁻, malgré l'absence de différence retrouvée dans la fréquence entre les deux groupes, présente des marqueurs d'activation et d'adhésion cellulaires à un niveau plus élevé chez les patients répondeurs, principalement avant le traitement, et pourrait ainsi jouer un rôle dans la réponse antitumorale.

DISCUSSION

La recherche de biomarqueurs immunologiques prédictifs de réponse au traitement par immunothérapie a fait l'objet de nombreuses recherches dès l'avènement des bloqueurs de points de contrôle immunitaire : les anti-PD-1 et anti-CTLA-4. En effet, malgré le réel succès de cette thérapeutique, seule une partie des patients présente un bénéfice sur la survie globale. Le développement de biomarqueurs permettra dans les années à venir d'anticiper le mieux possible l'absence de réponse au traitement ou la survenue d'effets secondaires graves liés à l'immunité afin de pouvoir orienter la stratégie thérapeutique pour chaque patient (médecine personnalisée). Ces recherches nous aident également à mieux comprendre le système immunitaire en situation tumorale et de ce fait les mécanismes de résistance à l'immunothérapie.

A l'heure actuelle, très peu d'études ont retrouvé des biomarqueurs prédictifs de réponse au niveau du sang périphérique, les recherches étant plutôt concentrées sur le tissu tumoral. En utilisant le sang périphérique des patients, nous avons l'avantage d'une méthode accessible, réalisable en routine et peu invasive afin de détecter un marqueur prédictif de réponse au traitement.

Dans cet objectif, nous avons analysé par cytométrie en flux les cellules du système immunitaire de dix-neuf patients atteints de mélanome métastatique, leur niveau de différenciation et d'activation ainsi que leur production en cytokines. Il s'agit d'une analyse préliminaire des données dans laquelle nous avons exploré principalement les résultats obtenus sur les sous-populations de cellules dont la numération ou la fréquence étaient différentes entre patients répondeurs et non répondeurs.

▪ *Lymphocytes T CD4⁺*

Les lymphocytes T CD4⁺, nommés également LT helper (LTh), sont une sous-population de cellules dites auxiliaires, composée de plusieurs sous-types fonctionnels en rapport avec diverses sécrétions cytokiniques. Les LT CD4⁺ sont des cellules au rôle majeur dans l'orientation des réponses immunes. Dans cette étude, nous retrouvons une fréquence et une numération plus élevées de LT CD4⁺ chez les patients répondeurs, au premier ainsi qu'au deuxième prélèvement. Les patients répondeurs présentent une variation de cette sous-population entre les deux prélèvements qui est significativement moins élevée après le début de l'immunothérapie. Ce résultat pourrait suggérer un recrutement chez les patients répondeurs des LT CD4⁺ au niveau du tissu tumoral ou des organes lymphoïdes secondaires, après initiation de l'immunothérapie.

Il nous a semblé intéressant de comprendre quels sous types fonctionnels de LT CD4⁺ étaient impliqués dans la réponse antitumorale chez les patients répondeurs. Afin de mieux caractériser cette sous-population, nous avons analysé les sécrétions des cytokines produites après activation en PHA. Nous mettons en évidence une corrélation entre les LT CD4⁺ et les sécrétions d'IL-2, IL-4, IL-13 et IL-9, et nous notons chez les répondeurs une sécrétion plus importante d'IL-4 par rapport aux non répondeurs après le début de l'immunothérapie. Ces résultats peuvent paraître surprenants car les données de la littérature placent les LTh1, sécréteurs d'IL-2, IFN- γ et TNF- α en acteurs majeurs de la réponse antitumorale, de façon antagoniste aux LTh2. En effet, l'IFN- γ inhiberait le développement des LTh2 et inversement, l'IL-4 inhiberait le développement des LTh1 (8). Dans notre étude, nous ne retrouvons pas de corrélation entre la production d'INF- γ et la

numération des LT CD4⁺ et nous ne mettons pas en évidence de différence significative pour la production de cette cytokine entre répondeurs et non répondeurs.

Cependant, l'hypothèse que nous pouvons faire s'appuie sur une donnée récente de la littérature sur l'action des LTh9 et leur relation avec les LTh2. En effet, nous retrouvons une corrélation significative entre les LT CD4⁺ et la sécrétion d'IL-9 après stimulation en PHA, suggérant ainsi qu'une partie des LT CD4⁺ sont polarisés en LTh9, sécréteurs d'IL-9. De plus, nous retrouvons une différence significative de sécrétion d'IL-9 qui apparaît plus importante chez les patients répondeurs que chez les patients non répondeurs après le début du traitement. Or, les LTh9 sont des cellules induites par les LTh2 sous l'influence de TGF- β et d'IL-4 (35,36) mais dont le rôle en situation tumorale n'a pas encore été clairement établi (37). Dans un modèle murin de mélanome, une étude rapporte les LTh9 comme une sous-population de cellules favorisant l'activité antitumorale (37). Plus récemment, Nonomura et al. proposent les LTh9 comme un biomarqueur de réponse au traitement par immunothérapie. En effet, ils retrouvent une augmentation de la fréquence des LTh9 statistiquement significative chez les répondeurs par rapport aux non répondeurs avant le traitement. In vitro, ils démontrent que les anti-PD-1 renforcent la différenciation des LTh9 induite par l'IL-4 et le TGF- β (38).

En retrouvant une production plus élevée des cytokines IL-9 et IL-4 chez les patients répondeurs que chez les patients non répondeurs après l'immunothérapie, nous venons appuyer ces données et faisons l'hypothèse d'un rôle antitumoral des LTh9 favorisé par l'immunothérapie. Ces résultats sont très stimulants et nous encourageant à poursuivre les recherches sur les LTh9.

▪ *Lymphocytes T régulateurs*

Nous retrouvons de façon significative une fréquence plus élevée de T reg chez les patients répondeurs au traitement. Ce résultat pourrait paraître initialement incompatible avec les données de la littérature. Rappelons qu'il s'agit d'une sous-population lymphocytaire T CD4⁺ auxiliaire, exprimant les marqueurs CD4, CD25 et le facteur de transcription FoxP3 (8). Dans cette étude, nous n'avons pas utilisé FoxP3 comme marqueur pour identifier ces cellules car cela aurait nécessité une technique de marquage intra-cytoplasmique délicate à standardiser, mais nous avons caractérisé les T reg parmi les LT CD4⁺ sur l'expression des marqueurs CD25 et CD127 (CD25^{hi} CD127^{low}), stratégie validée par d'autres auteurs (39,40).

L'activité immunosuppressive des T reg dans le micro-environnement tumoral repose sur divers mécanismes : la suppression des cellules dendritiques par contact direct cellule à cellule, l'induction de l'apoptose des cellules T par l'expression de granzyme B et galactine 1, la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme IL-10, TGF- β et IL-35, et l'expression de marqueurs inhibiteurs comme le CTLA-4 et le PD-1. Le rôle des lymphocytes T reg apparaît comme crucial dans le mécanisme d'échappement tumoral et leur accumulation dans le tissu tumoral est corrélée à un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers : le carcinome ovarien, le cancer du pancréas, le carcinome hépatocellulaire, le cancer du sein, le cancer du rein, ainsi que le cancer pulmonaire (8,41,42).

Cependant, cette activité immunosuppressive en situation tumorale est contestée et plusieurs études discordantes ont été publiées quant à la valeur pronostique des T reg. En effet, ils sont rapportés comme facteur de bon pronostic lorsqu'ils sont retrouvés en forte densité dans les tissus tumoraux du lymphome folliculaire, lymphome de Hodgkin, cancer ORL, ainsi que du cancer colorectal associé à des instabilités micro-satellitaires (8,41,43). Ces

données peuvent s'expliquer du fait que le recrutement des T reg au niveau du site tumoral est possiblement concomitant au recrutement des autres cellules immunes, mais aussi de par leur rôle protecteur envers la composante inflammatoire chronique retrouvée dans ces cancers (8,44). Plus récemment, l'hypothèse d'une hétérogénéité parmi les T reg a été mise en avant, reflétant l'existence de diverses sous-populations en fonction de l'expression de FoxP3 et du marqueur CD45RA (effector T reg, helper-like T reg, « resting » Treg, et « non-suppressive » T reg). Les LT ayant un grand pouvoir d'adaptabilité et de plasticité, ces différents phénotypes de T reg ne sont pas figés et peuvent évoluer en fonction des stimulations du micro-environnement tumoral (44,45).

Concernant le mélanome, plusieurs travaux se sont intéressés aux T reg. Dans un modèle animal, leur diminution induirait une meilleure réponse antitumorale et une augmentation de la survie (46). Chez les patients atteints de mélanome, les études rapportent une accumulation des T reg dans le sang, dans la tumeur ainsi que dans les ganglions métastatiques (47–49) et une augmentation du nombre de T reg dans les tissus tumoraux et le sang périphérique serait en rapport avec un moins bon pronostic (50–52).

Dans notre étude, nous retrouvons une plus grande fréquence de T reg chez les patients répondeurs au traitement. L'hypothèse que nous pouvons faire d'une part, est qu'il s'agisse d'une sous-population de T reg naïfs associés à un bon pronostic, non immunosuppresseurs. Il faudrait pour cela mieux caractériser cette sous-population en recherchant par exemple si les récepteurs des chemokines CCR4 CXCR3 CCR6 sont exprimés ou non à la surface des cellules, comme décrit dans l'étude de Halim et al. (53).

La deuxième hypothèse que nous avançons est que le traitement par immunothérapie pourrait agir directement sur les T reg. Du fait de leur rôle essentiel dans le mécanisme

d'échappement tumoral, ils semblent être une cible idéale pour une thérapeutique anticancéreuse. En effet, le mécanisme des immunothérapies anti-CTLA-4 et anti-PD-1 reste encore peu clair et mal connu. La majorité des études rapportent un mécanisme d'action sur les lymphocytes T effecteurs, mais peu de données sont retrouvées sur les lymphocytes T reg (42).

Comme vu dans l'introduction, les anti-CTLA-4 seraient bloqueurs de la liaison entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T effecteur (lors de l'initiation des réponses immunes dans les organes lymphoïdes secondaires), tandis que les anti-PD-1 seraient bloqueurs de l'interaction entre la cellule tumorale et le lymphocyte T effecteur (au site tumoral lors de la phase effectrice). Ces mécanismes d'actions sont actuellement remis en cause puisque nous savons que les T reg expriment également à leur surface les molécules inhibitrices CTLA-4 et PD-1 et que le niveau d'expression de ces molécules en situation tumorale est augmenté (44,54–56).

Ainsi, plusieurs études suggèrent que l'immunothérapie anti-CTLA-4 et anti-PD-1 aurait un effet prédominant sur les T reg, soit en induisant leur déplétion, soit en diminuant leur activité immunosuppressive (55,57–59). L'effet de l'immunothérapie serait multiple, elle pourrait favoriser l'induction de la prolifération lymphocytaire CD8⁺, la production de cytokines antitumorales (IL-2 et INF- γ) et l'augmentation du ratio T effecteurs/T reg (42,60). De plus, un des mécanismes d'action des anti-PD1 sur les T reg pourrait être la diminution d'expression de FoxP3 (61). (Figure 24)

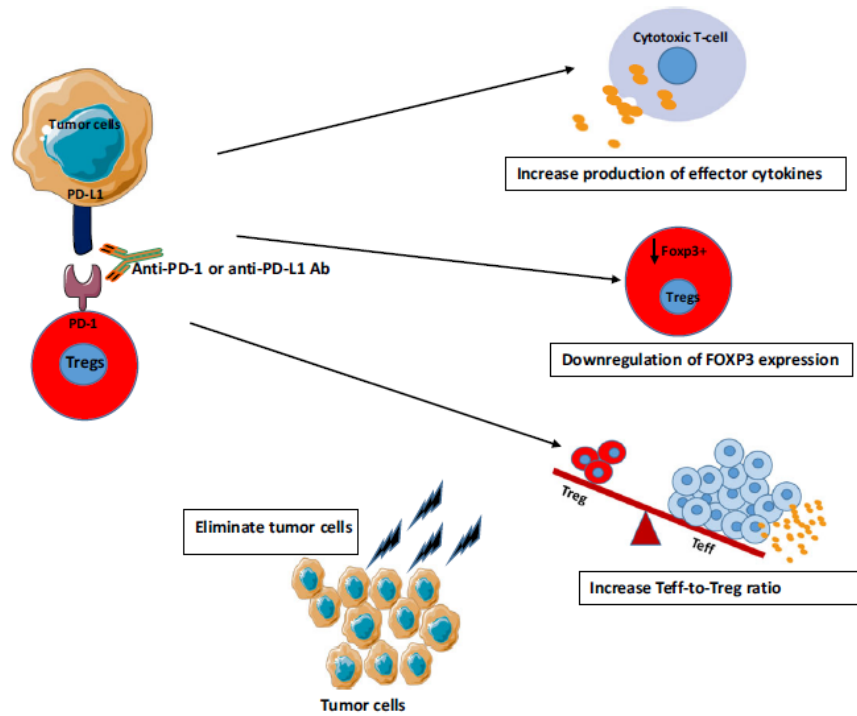


Figure 24 (d'après Sasidharan Nair et al.) - Effet des anti-PD-1/anti-PD-L1 sur les T reg

Dans notre étude, nous ne retrouvons pas de différence statistiquement significative sur la fréquence des T reg entre les deux prélèvements, ce qui suggère qu'il n'y a pas eu de déplétion de cette sous-population par le traitement, mais notre temps d'observation est relativement court. En revanche, du fait d'une plus grande fréquence de T reg avant le début du traitement chez les patients répondeurs, nous soutenons l'hypothèse d'un rôle direct de l'immunothérapie sur l'inhibition des réponses immunes induite par les T reg, qui deviennent alors une cible du traitement. On peut en effet supposer que chez les patients qui ont un plus grand nombre de T reg, ces cellules ont un rôle important dans la progression tumorale et que sous l'effet des bloqueurs de points de contrôle immun, leur action pro-tumorale soit ainsi bloquée. De ce fait, cette sous-population cellulaire initialement immunosuppressive et en lien avec un mauvais pronostic pourrait devenir un facteur prédictif de bonne réponse au traitement.

- *mDC BDCA3⁺*

Les mDC BDCA3⁺ représentent la majeure partie des mDC du système immunitaire, elles expriment le marqueur BDCA1 (CD1c), que nous n'avons pas utilisé dans notre panel de phénotypage. Rappelons qu'il s'agit des cellules présentatrices d'antigènes dites « professionnelles », qui jouent un rôle majeur dans l'immunité antitumorale en initiant la réponse immune, par la capture, l'apprêtement, la présentation des antigènes ainsi que la sécrétion de grandes quantités d'IL-12. Dans notre étude, nous retrouvons une diminution de la fréquence de ces cellules dans le temps chez les répondeurs, avec une fréquence significativement moins élevée au P2 chez les répondeurs par rapport aux non répondeurs. Nous faisons l'hypothèse que cette fréquence moins élevée après traitement peut être le résultat d'un recrutement des mDC dans les tissus tumoraux sous l'effet du traitement, contribuant de ce fait à l'efficacité de la réponse antitumorale.

De plus, nous notons que ces cellules présentent à leur surface avant traitement une expression des marqueurs CD86, CD66b et CD16 de façon significativement plus élevée chez les répondeurs que chez les non répondeurs. Ces résultats suggèrent que les patients répondeurs présentent des mDC plus aptes à l'activation et peut-être à la migration que les patients non répondeurs, qu'il s'agit de cellules dont le rôle est primordial dans la réponse antitumorale au niveau tissulaire et qu'elles pourraient participer au mécanisme d'action des bloqueurs de points de contrôle immunitaire.

▪ *Monocytes*

Nous ne notons pas de différence significative dans la fréquence des monocytes classiques entre les patients répondeurs et non répondeurs, ni avant ni après le début du traitement par immunothérapie. Ce résultat est contradictoire avec l'étude de Krieg et al. publiée récemment, pour une population de patients et une puissance de cohorte comparable. Krieg conclut qu'une fréquence élevée en monocytes CD14⁺ CD16⁻ HLA-DR^{hi} avant traitement par immunothérapie anti-PD-1 est corrélée à une meilleure survie et propose ce résultat en tant que biomarqueur de réponse au traitement (33). L'utilisation de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) décongelées pour l'analyse de Krieg pourrait entraîner des biais liés à la manipulation de l'échantillon, comme la perte de cellules notamment, contrairement à l'utilisation du sang total comme dans notre étude.

Nous nous sommes néanmoins intéressées à cette sous-population qui révèle présenter des marqueurs d'adhésion et d'activation (CD86 et CD66b) plus fortement exprimés chez les répondeurs avant traitement, ainsi que les marqueurs CRTH2 et CD127, exprimés faiblement, et dont la fonction sur les monocytes n'est pas décrite. Ces résultats sont intéressants puisque l'on sait que les monocytes peuvent se différencier en macrophages et en cellules dendritiques dans les tissus sous l'effet des cytokines présentes dans le micro-environnement tumoral et avoir ainsi un rôle essentiel dans les mécanismes de défense antitumorale.

Dans notre étude, la présence de monocytes avec un phénotype activé semble favorable à la réponse au traitement, sans que l'on puisse en déterminer un possible biomarqueur de réponse au traitement.

▪ *Limites de l'étude et perspectives*

Cette étude préliminaire du système immunitaire des patients atteints de mélanomes métastatiques sous immunothérapie via un immunomonitoring à partir du sang périphérique a permis d'inclure dix-neuf patients en cours de traitement. Il s'agit d'une petite cohorte, dont la puissance statistique nécessaire au développement d'un biomarqueur prédictif de réponse au traitement est insuffisante. Il est donc nécessaire de poursuivre l'inclusion des patients dans l'étude afin d'en augmenter l'effectif et d'apporter plus de fiabilité et de robustesse à nos résultats.

Nous avons ici fait le choix d'amorcer l'étude des données par l'analyse des fréquences et numérations des sous-populations pour lesquelles nous avons une différence statistiquement significative entre répondeurs et non répondeurs, et nous nous sommes ensuite intéressées à ces différentes populations concernant leur niveau d'expression de différents marqueurs d'intérêt et leur production de cytokines. L'analyse approfondie des autres sous-populations cellulaires est à poursuivre et pourra se révéler très intéressante. En effet, notre panel permet d'analyser en détail des sous-populations de cellules immunes diverses au sein des principaux types de cellules (par exemple : monocytes CD16⁺, différentes sous-populations de NK (CD56⁺, CD56⁻), éosinophiles et neutrophiles, lymphocytes B CD11c⁺ ou CD5⁺, LT CD8^{hi} ou LT CD8^{low}). Ces sous-populations n'ont pas encore été décrites précisément en contexte de mélanome et pourraient donc apporter des informations intéressantes.

De plus, les analyses statistiques pourront être complétées avec par exemple la création de « heat maps » ou d'analyses en composantes principales afin de déterminer les paramètres qui évoluent ensemble et qui peuvent de ce fait définir des signatures composées de

plusieurs facteurs, comprenant par exemple la fréquence, le niveau d'activation et la sécrétion de cytokines.

Par ailleurs, il serait intéressant de comparer nos résultats avec les analyses anatomopathologiques des prélèvements tissulaires appariés issus des patients afin d'analyser la qualité de l'infiltrat immun dans les tumeurs et de rechercher une concordance avec les données retrouvées dans le sang périphérique.

Pour finir, la corrélation des paramètres immunologiques des patients avant le traitement avec la survenue, ou non, d'effets indésirables liés au traitement et avec leur niveau de sévérité pourra nous permettre d'adapter au mieux la prise en charge thérapeutique des patients en déterminant un possible biomarqueur prédictif de toxicité à l'immunothérapie. En effet, la plupart des effets secondaires graves qui surviennent chez les patients sont dus à une exacerbation des réponses immunes qui pourrait peut-être être corrélée à l'état du système immunitaire des patients avant le traitement. Cet immunomonitoring pourrait également permettre d'identifier les voies cellulaires et/ou cytokiniques impliquées dans la survenue de ces effets secondaires dysimmunitaires et de les cibler afin d'optimiser la prise en charge des patients.

Les résultats présentés dans ce travail doivent être confortés pour définir quels biomarqueurs peuvent, seuls ou en combinaison, être utilisés pour prédire la réponse au traitement ou la survenue d'effets secondaires. Une telle approche d'immunomonitoring phénotypique et fonctionnel sur sang total semble très prometteuse à l'ère des bloqueurs de points de contrôle immunitaire. En effet la réalisation d'un prélèvement sanguin périphérique est facilement réalisable, peu invasive et a très peu d'impact sur la qualité de vie du patient. Cette approche pourrait donc être proposée ultérieurement pour les autres

patients atteints de tumeurs solides ou de pathologies hématologiques malignes et traités par immunothérapie dans le suivi des réponses aux traitements ou des toxicités induites.

TITRE :

IMMUNOMONITORING PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNEL DE PATIENTS
ATTEINTS DE MELANOME METASTATIQUE SOUS IMMUNOTHERAPIE :
RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PREDICTIFS DE REPONSE AU
TRAITEMENT

CONCLUSION

Le développement de biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement par immunothérapie, robustes et facilement accessibles, est une étape indispensable afin d'atteindre l'objectif de la personnalisation du traitement antitumoral pour chaque patient.

Les pistes évoquées ici sont encourageantes. Nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre la numération en lymphocytes T CD4⁺ dans le sang des patients et la sécrétion de cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) et Th9 (IL-9), et nos résultats montrent que les patients répondeurs aux immunothérapies ont une fréquence plus élevée de lymphocytes T CD4⁺ associée à une sécrétion plus importante d'IL-4, IL-13 et IL-9 que les patients non-répondeurs. Il sera intéressant de poursuivre ces investigations afin de confirmer ces résultats, et de comprendre comment les lymphocytes T CD4⁺ de type Th2 ou Th9 sont impliqués dans la réponse aux immunothérapies. Dans notre étude, les lymphocytes T régulateurs apparaissent comme une sous population clé dans la réponse au traitement, qui pourrait être directement visée par les anti-CTLA-4

et/ou anti-PD-1. Ainsi, une fréquence diminuée en T reg circulants avant le traitement apparait comme un possible biomarqueur prédictif d'échec au traitement. D'autre part, les monocytes et mDC semblent avoir, au vu de l'expression de marqueurs d'activation plus importante à leur surface, un profil de cellules plus activées, ou plus matures chez les patients répondeurs.

Devant la complexité et la variabilité du système immunitaire de chaque individu, ces résultats doivent être confirmés par une étude prospective, multicentrique, de plus grande envergure et possiblement couplée à des analyses anatomopathologiques des tissus tumoraux des patients afin d'apporter plus de fiabilité à nos résultats. De plus, l'analyse des récepteurs des chemokines à la surface des cellules afin de mieux déterminer le niveau de recrutement des cellules au sein de la tumeur pourrait également ouvrir de nouvelles pistes de recherche.

Enfin, une meilleure compréhension du système immunitaire des patients atteints de mélanome nous donne l'espoir de développement de nouvelles thérapeutiques, ciblant d'autres points de contrôles immunitaires.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 15/06/2018

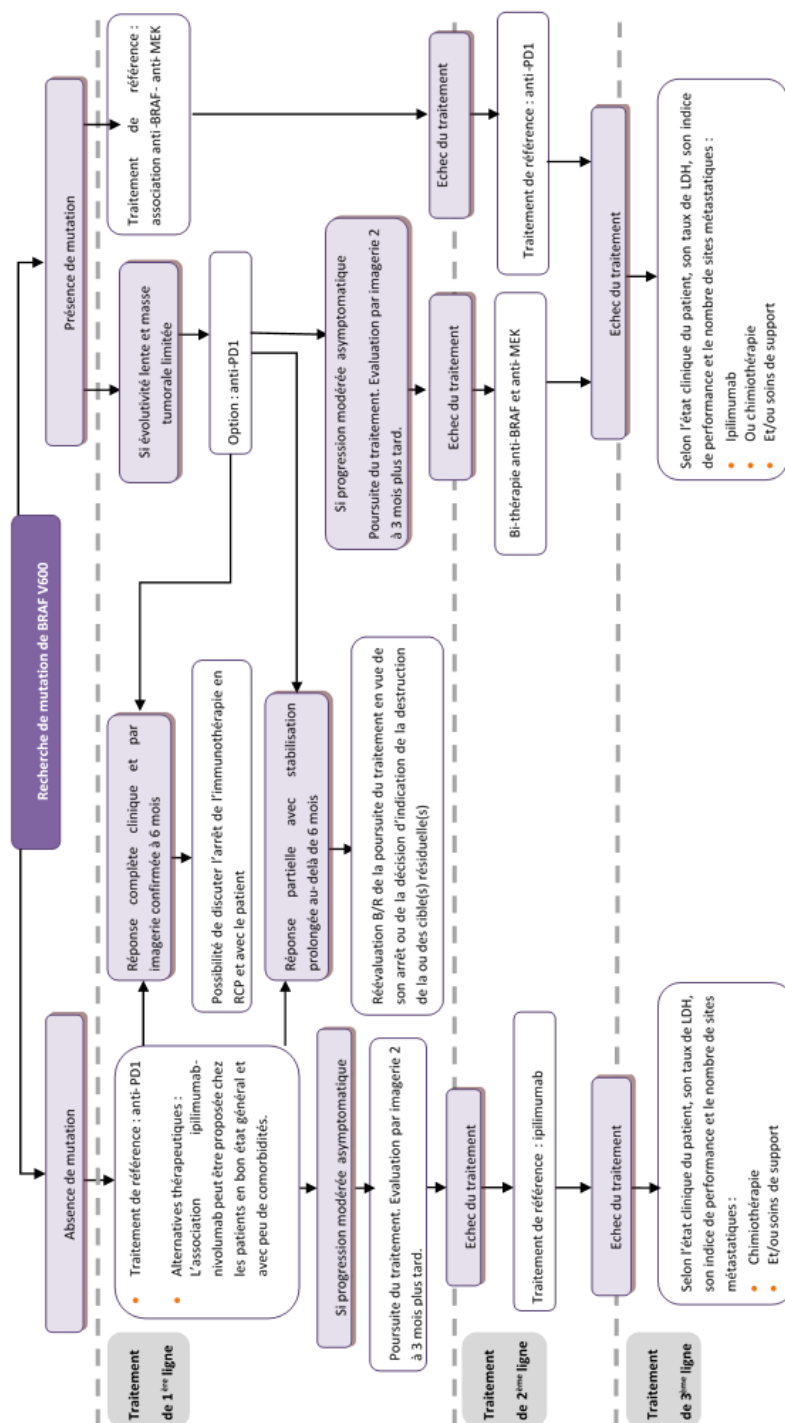
Le Doyen de l'UFR de Médecine

LE DOYEN
Dr. Patrice MORAND
Patrice MORAND

LE PRESIDENT DE LA THESE
PROFESSEUR Marie-Thérèse LECCIA

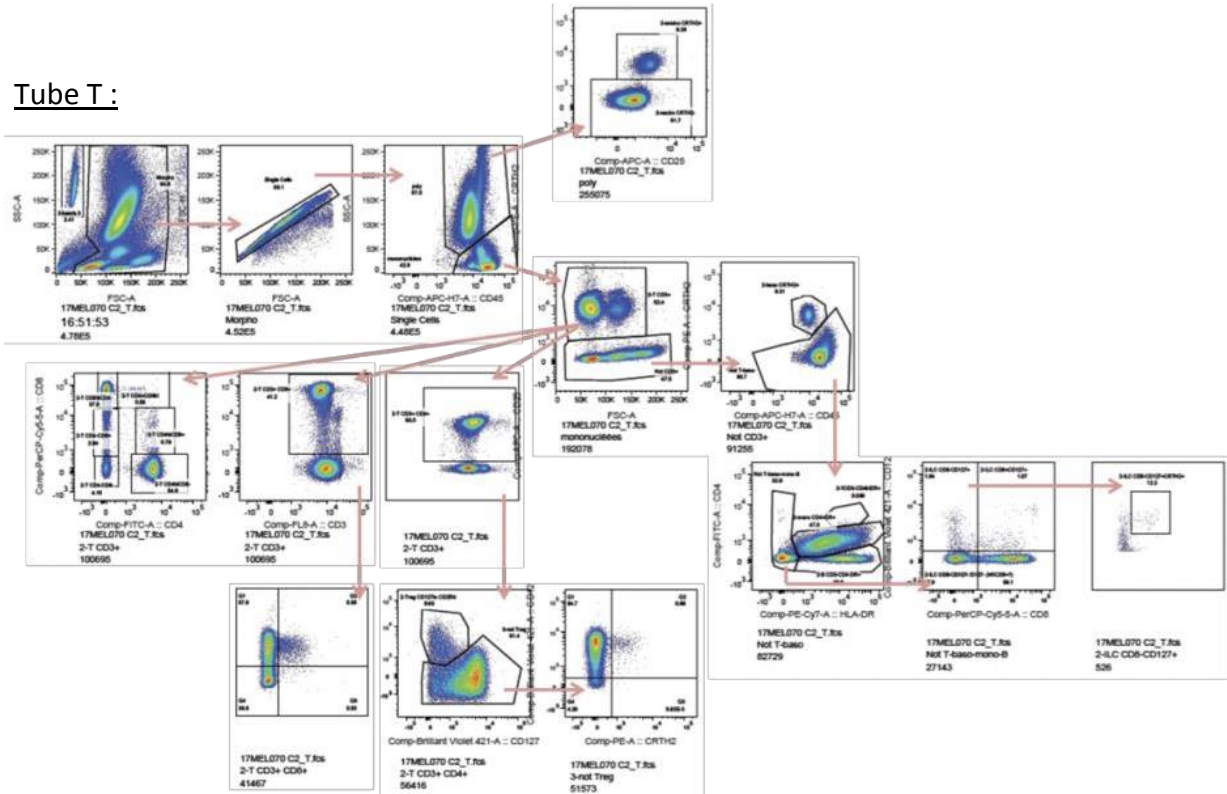
ANNEXES

- **Annexe 1 (d'après Guillot et al.) - Recommandations des traitements systémiques de 1ère, 2ème et 3ème ligne des mélanomes cutanés métastatiques non résecables (stade III inopérables et stades IV) hors métastase cérébrale**

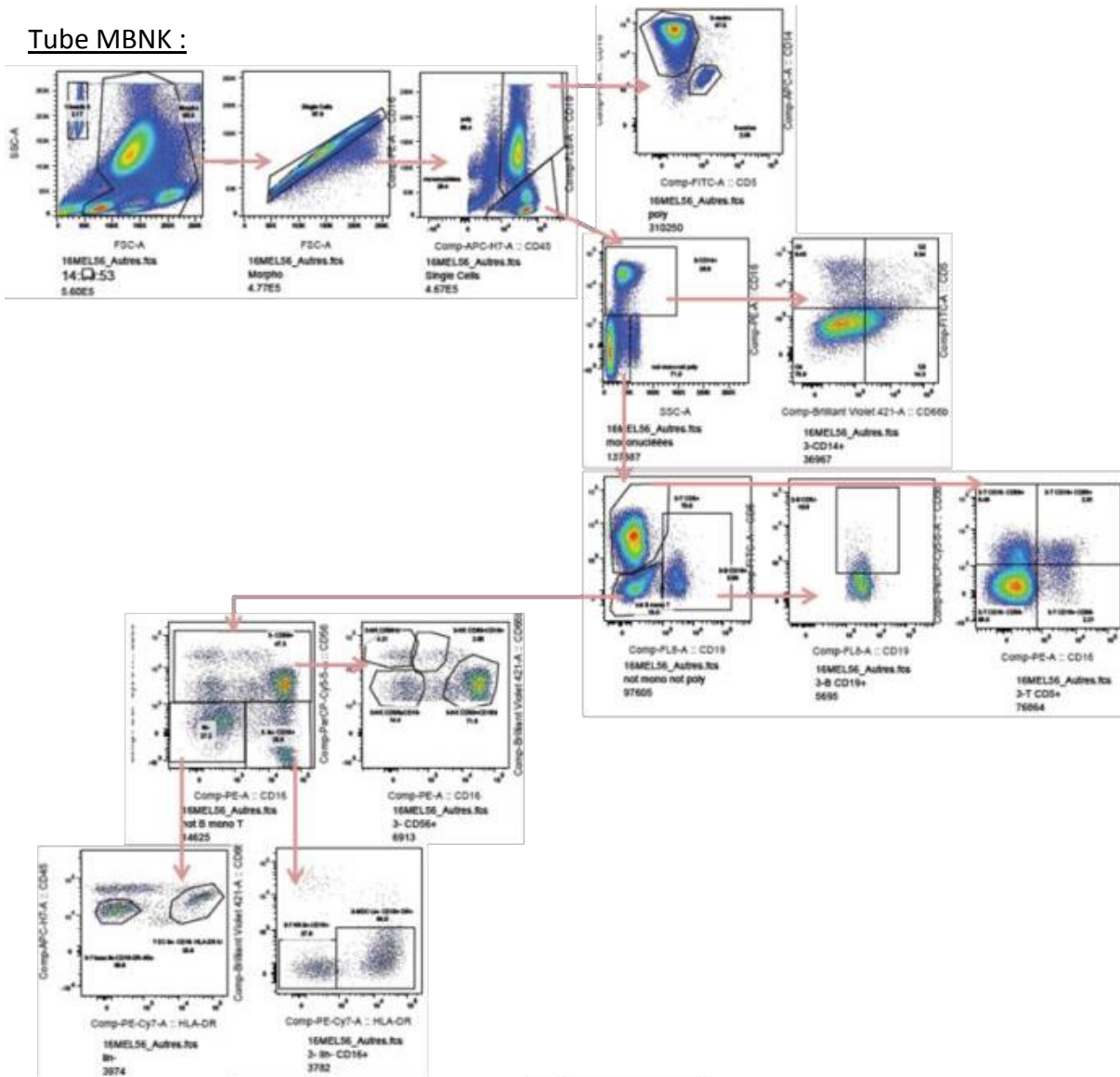


▪ Annexe 2 - Stratégie de gating sur tube T, tube MBNK, tube Mel suivi

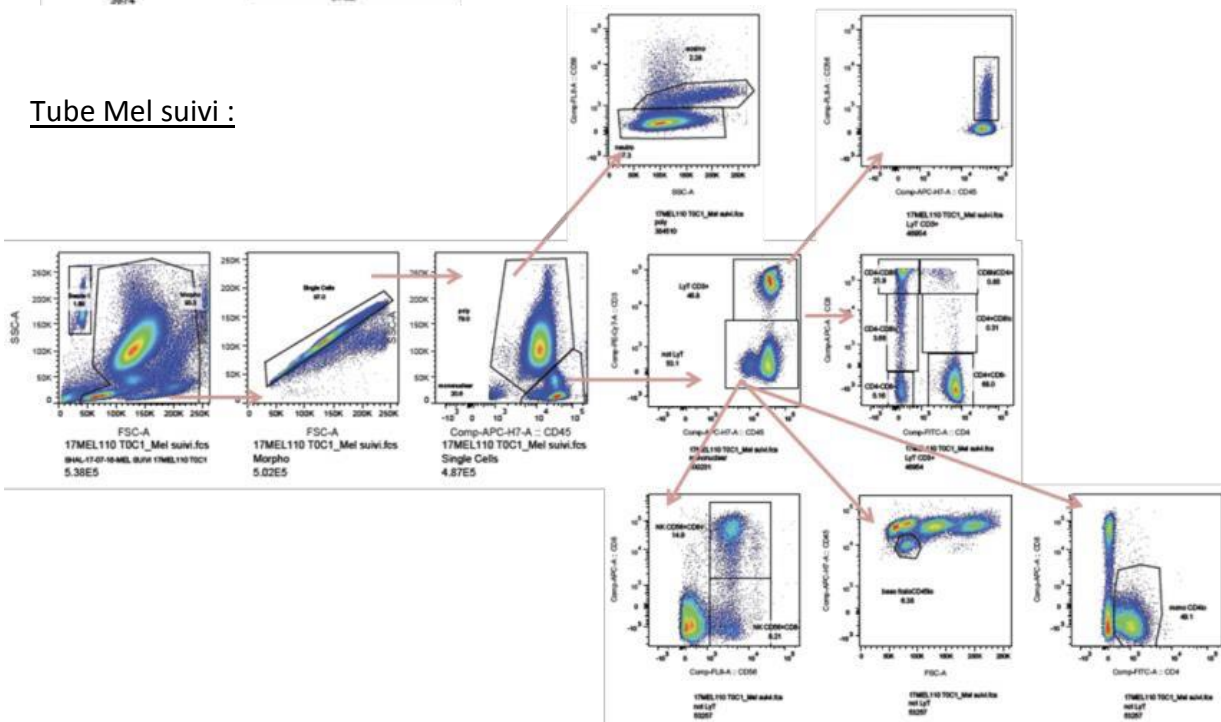
Tube T :



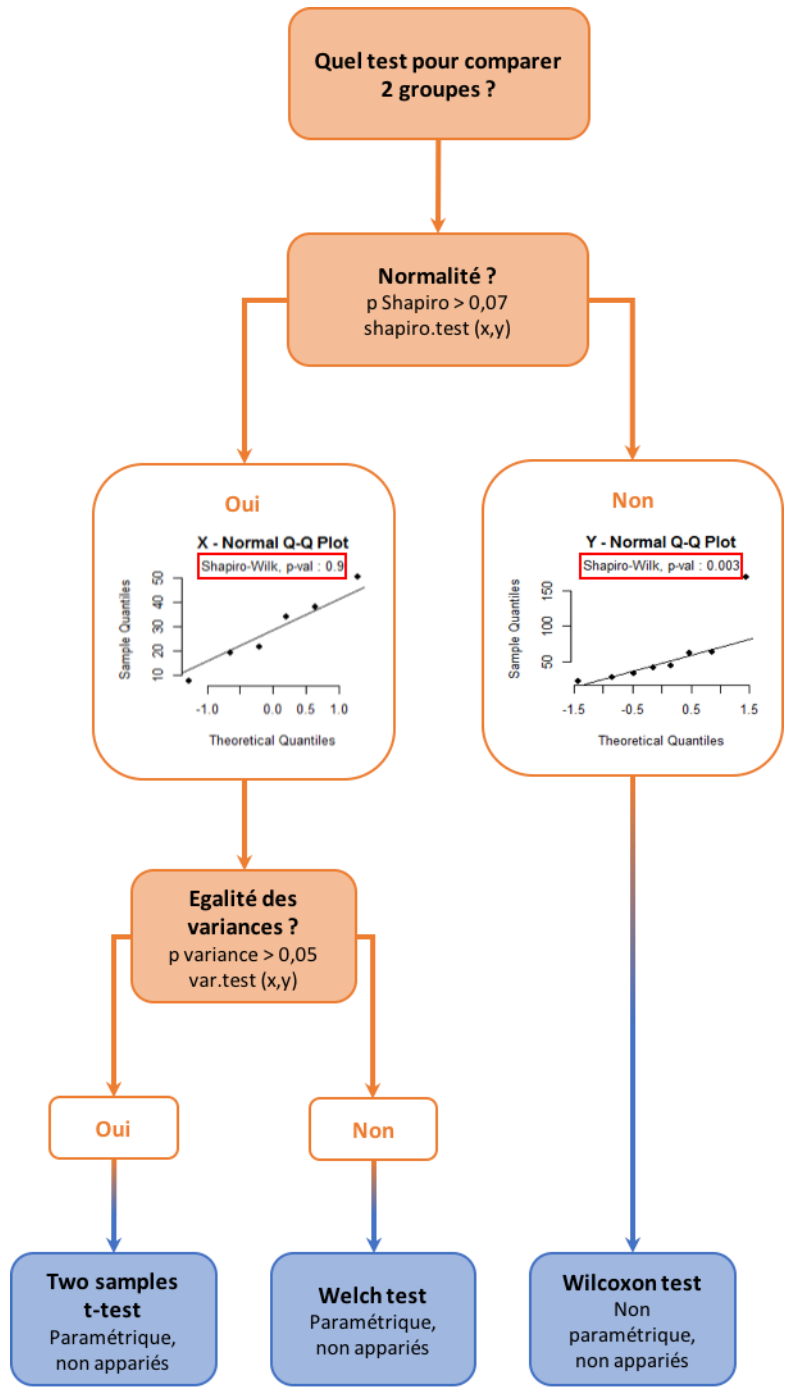
Tube MBNK :



Tube Mel suivi :



▪ *Annexe 3 - Arbre décisionnel pour l'utilisation des tests statistiques*



▪ **Annexe 4 - Tableau des analyses comparatives entre le groupe répondeurs et non répondeurs sur les principales sous-populations du système immunitaire, au prélèvement 1 et 2**

Populations	Prélèvement	Paramètres	Test statistiques	p-values	Significatif ?	Tendance
Mononucléées	P1	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,6048	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,9404	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,2621	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,4733	Non	/
MDC	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,2213	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Wilcoxon test	0,4363	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,6806	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,003561	Oui	NR > R
PDC	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,9865	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Welch two sample t-test	0,4339	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,8397	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Welch two sample t-test	0,2802	Non	/
Monocytes	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,05685	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,8399	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,2076	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Welch two sample t-test	0,9583	Non	/
NK	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,9512	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Wilcoxon test	1	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,8155	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,3896	Non	/
LB	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,332	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,1669	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,7577	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,3559	Non	/
LT	P1	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,2973	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,08798	Non	R >NR
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,1304	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,1768	Non	/
LT CD4 ⁺	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,04653	Oui	R >NR
		Fréquence (% MNC)	Wilcoxon test	0,03898	Oui	R >NR
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Welch two sample t-test	0,08565	Non	R >NR
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,04888	Oui	R >NR
LTH2	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,06302	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Wilcoxon test	0,4698	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,04262	Oui	R >NR
		Fréquence (% MNC)	Wilcoxon test	0,3442	Non	/
T reg	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,06781	Non	R >NR
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,04318	Oui	R >NR
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,1079	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Welch two sample t-test	0,01247	Oui	R >NR
T CD3 ⁺ CD8 ⁺	P1	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	1	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,8414	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,4452	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,9751	Non	/
Basophiles	P1	Numération (cellule/ μ L)	Two sample t-test	0,5754	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Two sample t-test	0,9879	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,2991	Non	/
		Fréquence (% MNC)	Wilcoxon test	0,1903	Non	/
Polynucléées	P1	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,6665	Non	/
		Fréquence (% Poly)	Two sample t-test	0,881	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,8884	Non	/
		Fréquence (% Poly)	Two sample t-test	0,4348	Non	/
Eosinophiles	P1	Numération (cellule/ μ L)	Welch two sample t-test	0,7672	Non	/
		Fréquence (% Poly)	Welch two sample t-test	0,4315	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,09073	Non	R >NR
		Fréquence (% Poly)	Wilcoxon test	0,2581	Non	/
Neutrophiles	P1	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,7304	Non	/
		Fréquence (% Poly)	Welch two sample t-test	0,4354	Non	/
	P2	Numération (cellule/ μ L)	Wilcoxon test	0,8371	Non	/
		Fréquence (% Poly)	Wilcoxon test	0,233	Non	/

- **Annexe 5 - Tableau des analyses comparatives de production de cytokines entre le groupe répondeurs et non répondeurs, au prélèvement 1 et 2, après stimulation en PHA**

Cytokines	Prélèvement	Test statistiques	p-values	Significatif ?	Tendance
IL10	P1	Two sample t-test	0,1546	Non	/
	P2	Two sample t-test	0,1989	Non	/
IL17A	P1	Welch two sample t-test	0,7797	Non	/
	P2	Welch two sample t-test	0,2766	Non	/
IL2	P1	Two sample t-test	0,2522	Non	/
	P2	Wilcoxon test	0,6943	Non	/
IL21	P1	Wilcoxon test	0,5331	Non	/
	P2	Wilcoxon test	1	Non	/
IFN- γ	P1	Wilcoxon test	0,1206	Non	/
	P2	Wilcoxon test	0,2319	Non	/
TNF	P1	Wilcoxon test	0,0289	Oui	R >NR
	P2	Wilcoxon test	0,6943	Non	/
IL13	P1	Two sample t-test	0,1922	Non	/
	P2	Two sample t-test	0,0756	Non	R >NR
IL9	P1	Two sample t-test	0,8909	Non	/
	P2	Wilcoxon test	0,08231	Non	R >NR
IL4	P1	Two sample t-test	0,09831	Non	R >NR
	P2	Two sample t-test	0,009104	Oui	R >NR

- **Annexe 6 - Tableau des analyses comparatives de production de cytokines entre le groupe répondeurs et non répondeurs, au prélèvement 1 et 2, après stimulation au R848**

Cytokines	Prélèvement	Test statistiques	p-values	Significatif ?	Tendance
IL10	P1	Two sample t-test	0,03073	Oui	NR >R
	P2	Wilcoxon test	0,2319	Non	/
IL17A	P1	Wilcoxon test	0,7658	Non	/
	P2	Wilcoxon test	0,6473	Non	/
IL12p70	P1	Two sample t-test	0,2417	Non	/
	P2	Welch Two Sample t-test	0,72	Non	/
IFN-α	P1	Wilcoxon test	1	Non	/
	P2	Wilcoxon test	0,6943	Non	/
IFN-γ	P1	Two sample t-test	0,4378	Non	/
	P2	Wilcoxon test	0,5358	Non	/
TNF	P1	Wilcoxon test	0,2593	Oui	/
	P2	Wilcoxon test	0,152	Non	/
IL8	P1	Wilcoxon test	0,2086	Non	/
	P2	Wilcoxon test	0,9538	Non	/
IL6	P1	Wilcoxon test	0,4557	Non	/
	P2	Wilcoxon test	0,6022	Non	/
IL1b	P1	Two sample t-test	0,8164	Non	/
	P2	Two sample t-test	0,19	Oui	/

BIBLIOGRAPHIE

1. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *The Oncologist*. 2011;16(1):5–24.
2. Guillot B, Charles J, Cupissol D. Recommandations/ Traitement des patients atteints de mélanome stade III inopérable ou de stade IV / Société Française de Dermatologie. 2017 Available from: <http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/reco-melanome-stade-iii-iv-synthese-final-compile-c5f48aad36038fae11a5cdb1448fc6ce.pdf>
3. 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*. 2015 Jan 22;372(4):320–30.
4. Schachter J, Ribas A, Long GV, Arance A, Grob J-J, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet Lond Engl*. 2017 Oct 21;390(10105):1853–62.
5. Weber JS, Postow M, Lao CD, Schadendorf D. Management of Adverse Events Following Treatment With Anti-Programmed Death-1 Agents. *The Oncologist*. 2016 Oct;21(10):1230–40.
6. Saâda-Bouزيد E, Defaucheux C, Karabajakian A, Coloma VP, Servois V, Paoletti X, et al. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2017 Jul;28(7):1605–11.
7. Champiat S, Dercle L, Ammari S, Massard C, Hollebecque A, Postel-Vinay S, et al. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 15;23(8):1920–8.
8. Zitvogel L, Hannani D, Martin F. Immunothérapie des cancers au troisième millénaire. 2014
9. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro J-M, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 2014 Dec 30;5(24):12472–508.
10. Bonnotte B, Hoarau C, Rosenzwaig M. Les cellules dendritiques. Available from: http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-5.-cellules-dendritiques.pdf
11. Lemoine F, Lebranchu Y, Boyer O. Immunité adaptative : lymphocytes T régulateurs et notion de tolérance. Available from: http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-13.-t-regulateurs-et-tolerance.pdf
12. De Carvalho M, Adotevi O, Frenkel V. Immunité adaptative : activation et polarisation des lymphocytes T. Available from: http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-12.-activation-t.pdf

13. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565–70.
14. Caux C. Immunothérapie : les checkpoints. *Rev Mal Respir Actual*. 2016 Sep;8(5):387–98.
15. 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.
16. Ma W, Gilligan BM, Yuan J, Li T. Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. *J Hematol Oncol*. 2016 27;9(1):47.
17. Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Nov;14(11):655–68.
18. 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.
19. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015 Apr;14(4):847–56.
20. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 May;16(5):275–87.
21. 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*. 2014 Nov 27;515(7528):568–71.
22. 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.
23. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Previously Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jul 2;373(1):23–34.
24. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016 10;375(19):1823–33.
25. U.S. Food and Drug Administration. Pembrolizumab (KEYTRUDA) checkpoint inhibitor. 2016. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/125514s024lbl.pdf
26. HAS Commission de la transparence/ KEYTRUDA. 2017. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-15941_KEYTRUDA_PIC_EI_poumon_1ere_ligne_Avis2_CT15941.pdf

27. 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*. 2016 Jun;126(9):3447–52.
28. Vilain RE, Menzies AM, Wilmott JS, Kakavand H, Madore J, Guminski A, et al. Dynamic Changes in PD-L1 Expression and Immune Infiltrates Early During Treatment Predict Response to PD-1 Blockade in Melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Sep 1;23(17):5024–33.
29. Frelau A, Pracht M, Le Sourd S, Lespagnol A, Corre R, Ménard C, et al. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immuns. *Bull Cancer (Paris)* 2018 Mar 7; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007455117303843>
30. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016 Mar 24;165(1):35–44.
31. 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.
32. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2017 May 4;545(7652):60–5.
33. Krieg C, Nowicka M, Guglietta S, Schindler S, Hartmann FJ, Weber LM, et al. High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Med*. 2018 Feb;24(2):144–53.
34. Fournier LS, Ammari S, Thiam R, Cuénod C-A. Critères de la réponse tumorale en imagerie : RECIST, mRECIST, Cheson. *Datarevues*22115706v95i7-8S2211570614002859. 2014 Jul 31; Available from: <http://www.em-consulte.com/en/article/912675>
35. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1341–6.
36. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1347–55.
37. Lu Y, Hong S, Li H, Park J, Hong B, Wang L, et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest*. 2012 Nov;122(11):4160–71.
38. Nonomura Y, Otsuka A, Nakashima C, Seidel JA, Kitoh A, Dainichi T, et al. Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1248327.
39. Saison J, Demaret J, Venet F, Chidiac C, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. CD4+CD25+CD127- assessment as a surrogate phenotype for FOXP3+ regulatory T

- cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Feb;84(1):50–4.
40. Chen Y, Chen X, Qin L, Yang Y, Tang Y. [The subpopulation CD4(+); CD25(+); Foxp3(+);/CD127(low/-); regulatory T cells in peripheral blood of HIV-infected patients correlated with disease progression]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol.* 2012 Nov;28(11):1188–91.
 41. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012 15;12(4):298–306.
 42. Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunol Cell Biol.* 2018 Jan;96(1):21–33.
 43. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):186–92.
 44. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines.* 2016 Aug 6;4(3).
 45. Ward-Hartstonge KA, Kemp RA. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. *Clin Transl Immunol.* 2017 Sep;6(9):e154.
 46. Ouyang Z, Wu H, Li L, Luo Y, Li X, Huang G. Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2016 Jan;37(1):77–85.
 47. Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho M-S, Gorochov G, Dubertret L, et al. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004 Jul 15;173(2):1444–53.
 48. Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother Hagerstown Md 1997.* 2003 Feb;26(1):85–93.
 49. Jandus C, Bioley G, Speiser DE, Romero P. Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. *Cancer Immunol Immunother CII.* 2008 Dec;57(12):1795–805.
 50. Miracco C, Mourmouras V, Biagioli M, Rubegni P, Mannucci S, Monciatti I, et al. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep.* 2007 Nov;18(5):1115–22.
 51. Mougiakakos D, Johansson CC, Trocme E, All-Ericsson C, Economou MA, Larsson O, et al. Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. *Cancer.* 2010 May 1;116(9):2224–33.

52. Baumgartner JM, Gonzalez R, Lewis KD, Robinson WA, Richter DA, Palmer BE, et al. Increased survival from stage IV melanoma associated with fewer regulatory T Cells. *J Surg Res.* 2009 Jun 1;154(1):13–20.
53. Halim L, Romano M, McGregor R, Correa I, Pavlidis P, Grageda N, et al. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. *Cell Rep.* 2017 Jul 18;20(3):757–70.
54. Syed Khaja AS, Toor SM, El Salhat H, Faour I, Ul Haq N, Ali BR, et al. Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget.* 2017 16;8(20):33159–71.
55. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, et al. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res.* 2013 Jul;1(1):32–42.
56. Berger CT, Recher M. Immuno-régulation par les lymphocytes T régulateurs. 2015 Available from: <https://medicalforum.ch/fr/resource/jf/journal/file/view/article/smf/fr/fms.2015.02114/fms-02114.pdf/>
57. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med.* 2013 Aug 26;210(9):1695–710.
58. Tang F, Du X, Liu M, Zheng P, Liu Y. Anti-CTLA-4 antibodies in cancer immunotherapy: selective depletion of intratumoral regulatory T cells or checkpoint blockade? *Cell Biosci.* 2018;8:30.
59. Simeone E, Gentilcore G, Giannarelli D, Grimaldi AM, Caracò C, Curvietto M, et al. Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother CII.* 2014 Jul;63(7):675–83.
60. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 2;107(9):4275–80.
61. Wang W, Lau R, Yu D, Zhu W, Korman A, Weber J. PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells. *Int Immunol.* 2009 Sep;21(9):1065–77.