

ANNÉE 2016

2016 TOU3 1572

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Nouritza TOROSSIAN

le 26 Septembre 2016

**Etude pilote de l'évaluation multi-composante de
l'expression tumorale et micro-environnementale de
PD-L1 en tant que facteur prédictif de réponse dans
les mélanomes traités par inhibiteurs de PD-1.**

Directeur de thèse : Pr Nicolas MEYER

JURY

Monsieur le Professeur	Jean-Pierre DELORD	Président
Monsieur le Professeur	Nicolas MEYER	Assesseur
Madame le Professeur	Laurence LAMANT	Assesseur
Madame le Docteur	Camille LAURENT	Assesseur
Monsieur le Docteur	Carlos GOMEZ-ROCA	Suppléant
Monsieur le Professeur	Stéphane CULINE	Membre invité



TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2015

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE D.	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Y.	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL B	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. PUEL P.	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES F.
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. POURRAT
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	M. QUERLEU D.
Professeur Honoraire	M. CARTON	Professeur Honoraire	M. ARNE JL
Professeur Honoraire	Mme PUEL J.	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU J.
Professeur Honoraire	M. GOUZI	Professeur Honoraire	M. FORTANIER G.
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE J.
Professeur Honoraire	M. PASCAL	Professeur Honoraire	M. PESSEY JJ.
Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN JP
Professeur Honoraire	M. BAYARD	Professeur Honoraire	M. GERAUD G.
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE	Professeur Honoraire	M. PLANTE P.
Professeur Honoraire	M. FABIÉ	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL JF

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE	Professeur JL. ADER
Professeur CONTÉ	Professeur Y. LAZORTHES
Professeur MURAT	Professeur L. LARENG
Professeur MANELFE	Professeur F. JOFFRE
Professeur LOUVET	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur H. DABERNAT
Professeur CARATERO	Professeur M. BOCCALON
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur B. MAZIERES
Professeur COSTAGLIOLA	Professeur E. ARLET-SUAU
	Professeur J. SIMON

P.U. - P.H.		P.U. - P.H.	
Classe Exceptionnelle et 1ère classe		2ème classe	
M. ADOUE Daniel	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépat-Gastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BONNEVIALLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BRASSAT David	Neurologie	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. BUGAT Roland (C.E)	Cancérologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. CARRIE Didier	Cardiologie	M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie	M. GAME Xavier	Urologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	Mme GENESTAL Michèle	Réanimation Médicale
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. FRAYSSE Bernard (C.E)	Oto-rhino-laryngologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. LANG Thierry	Bio-statistique Informatique Médicale	M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. LANGIN Dominique	Nutrition	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne	M. PERON Jean-Marie	Hépat-Gastro-Entérologie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. MALAUDAUD Bernard	Urologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique	Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses	Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. MONROZIES Xavier	Gynécologie Obstétrique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
M. MOSCOVICI Jacques	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. PRADERE Bernard (C.E)	Chirurgie générale		
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépat-Gastro-Entérologie		
		P.U.	
		M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale

Professeur Associé de Médecine Générale
Dr. MESTHÉ Pierre

TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2015

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE D.	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Y.	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL B	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. PUEL P.	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES F.
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. POURRAT
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	M. QUERLEU D.
Professeur Honoraire	M. CARTON	Professeur Honoraire	M. ARNE JL
Professeur Honoraire	Mme PUEL J.	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU J.
Professeur Honoraire	M. GOUZI	Professeur Honoraire	M. FORTANIER G.
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE J.
Professeur Honoraire	M. PASCAL	Professeur Honoraire	M. PESSEY JJ.
Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN JP
Professeur Honoraire	M. BAYARD	Professeur Honoraire	M. GERAUD G.
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE	Professeur Honoraire	M. PLANTE P.
Professeur Honoraire	M. FABIÉ	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL JF

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE	Professeur JL. ADER
Professeur CONTÉ	Professeur Y. LAZORTHES
Professeur MURAT	Professeur L. LARENG
Professeur MANELFE	Professeur F. JOFFRE
Professeur LOUVET	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur H. DABERNAT
Professeur CARATERO	Professeur M. BOCCALON
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur B. MAZIERES
Professeur COSTAGLIOLA	Professeur E. ARLET-SUAU
	Professeur J. SIMON

M.C.U. - P.H.		M.C.U. - P.H.	
M. APOIL Pol Andre	Immunologie	Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie	M. BES Jean-Claude	Histologie - Embryologie
M. BIETH Eric	Génétique	M. CMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie	Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition	Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie	Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation	Mme CAUSSE Elisabeth	Biochimie
M. CONGY Nicolas	Immunologie	M. CHAPUT Benoît	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme COURBON Christine	Pharmacologie	M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie	Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie	M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme DE MAS Véronique	Hématologie	Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène	M. CORRE Jull	Hématologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène	M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
Mme DUGUET Anne-Marie	Médecine Légale	M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DUPUI Philippe	Physiologie	M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie	M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie	Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
M. GANTET Pierre	Biophysique	Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie	Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire	Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. HAMDJ Safouane	Biochimie	M. GASQ David	Physiologie
Mme HITZEL Anne	Biophysique	Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie	Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. JALBERT Florian	Stomatologie et Maxillo-Faciale	Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire	M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale	Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie	M. LAHARRAGUE Patrick	Hématologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique	M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
Mme LE TINNIER Anne	Médecine du Travail	Mme LAPRIE Anne	Cancérologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie	M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LOPEZ Raphael	Anatomie	Mme LEOBON Céline	Cytologie et histologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition	M. LEPAGE Benoît	Bio-statistique
M. MONTOYA Richard	Physiologie	Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
Mme MOREAU Marion	Physiologie	M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire	Mme NASR Nathalie	Neurologie
M. PILLARD Fabien	Physiologie	Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRERE Marie-Françoise	Bactériologie Virologie	Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie	M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
Mme RAGAB Janie	Biochimie	M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène	Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie	M. TKACZUK Jean	Immunologie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie	Mme VALLET Marion	Physiologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation	Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie		
M. TAFANI Jean-André	Biophysique		
M. TREINER Emmanuel	Immunologie		
Mme TREMOLLIERS Florence	Biologie du développement	M. BISMUTH Serge	M.C.U.
M. TRICOIRE Jean-Louis	Anatomie et Chirurgie Orthopédique	Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
M. VINCENT Christian	Biologie Cellulaire	Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr BRILLAC Thierry
Dr ABITTEBOUL Yves
Dr CHICOULAA Bruno
Dr IRI-DELAHAYE Motoko

Dr BISMUTH Michel
Dr BOYER Pierre
Dr ANE Serge

DECEMBRE 2015

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre DELORD

Président du jury

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Chef de Service

Oncologie Médicale

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury.

J'ai eu le privilège d'avoir une formation de qualité à vos côtés, à tous les niveaux ; je vous en suis extrêmement reconnaissante.

A Monsieur le Professeur Nicolas MEYER

Directeur de thèse

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Chef de Service

Oncodermatologie

Merci d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse, mais surtout merci infiniment pour tout le soutien apporté dans les moments difficiles ; je n'oublierai pas.

A Madame le Professeur Laurence LAMANT

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Anatomopathologie

Merci infiniment pour tout le travail que vous avez accepté de réaliser dans le cadre de cette thèse ; vous resterez pour moi un modèle de rigueur et d'efficacité.

A Madame le Docteur Camille LAURENT

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Anatomopathologie

Merci beaucoup d'avoir partagé vos connaissances et vos réflexions sur l'immuno-échappement, qui ont ajouté de la pertinence à ce travail et qui m'ont donné envie de continuer dans ce domaine.

A Monsieur le Docteur Carlos GOMEZ-ROCA

Praticien Spécialiste des Centres de Lutte Contre le Cancer

Oncologie Médicale

Merci de m'avoir fait découvrir les joies et les peines des phases 1, et pour toutes les explications physiopathologiques en toutes circonstances !

A Monsieur le Professeur Stéphane CULINE

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Chef de Service

Oncologie Médicale

Merci infiniment de m'accueillir dans votre service de renom ; je ferai tout mon possible pour ne pas vous décevoir.

A Monsieur le Professeur Guy LAURENT

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, ancien Chef de Service

Hématologie

Je ne vous remercierai jamais assez pour avoir tant appris, vécu et mûri avec vos enseignements, sur le plan médical, scientifique et des humanités ; ils m'accompagneront dans la suite de mon parcours.

A Madame le Docteur Brigitte De LAFONTAN

Praticien Spécialiste des Centres de Lutte Contre le Cancer

Radiothérapie

Merci beaucoup pour tous vos encouragements, qui m'ont mis du baume au cœur et qui m'ont aidé à avancer.

A Madame Laurence JALABERT

Technicienne de laboratoire

Anatomopathologie

Merci pour tout le travail généreusement effectué dans le cadre de cette thèse.

A tous les personnels médicaux et paramédicaux des services d'oncologie, hématologie, radiothérapie, dermatologie, anatomopathologie, médecine interne, urgences...

Du CHU de Toulouse et de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse,

Avec lesquels j'ai eu le plaisir et le privilège d'apprendre tant...

A ma famille et à mes amis, pour leur soutien de tous les jours dans mes études,

Depuis plus de onze ans...

Table des matières

I. INTRODUCTION	12
I.A Mélanome et système immunitaire.....	12
I.A.1 Immunogénicité des cancers en général et du mélanome en particulier	12
I.A.2 Le paysage immunitaire des cancers en général et du mélanome en particulier	16
I.B L'immunothérapie du mélanome	32
I.B.1 Les inhibiteurs des checkpoints immunologiques	32
I.B.2 Biomarqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs du checkpoint PD-1	35
I.B.3 Problématique et question posée.....	42
II. MATERIEL ET METHODES	43
II.A Patients	43
II.B Échantillons	43
II.C Réactifs et immunomarquages	43
II.D Lecture des immunomarquages	47
II.E Interprétation des immunomarquages	47
III. RESULTATS.....	48
III.A Caractéristiques de la population étudiée	48
III.A.1 Caractéristiques démographiques	48
III.A.2 Caractéristiques tumorales au diagnostic.....	48
III.A.3 Caractéristiques tumorales au stade métastatique.....	49
III.A.4 Statut mutationnel au diagnostic.....	49
III.A.5 Caractéristiques des échantillons analysés en immunohistochimie.....	49
III.B Valeur prédictive de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales observée dans notre série	51
III.B.1 Quantitative (seuil de positivité à 5% des cellules tumorales)	51
III.B.2 Qualitative : caractérisation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.....	52
III.C Evaluation de la valeur prédictive d'une expression multi-composante, micro-environnementale et tumorale de l'expression de PD-L1	56
III.C.1 Performances de l'algorithme de prédiction prenant en compte l'expression bi-composante de PD-L1 et le statut mutationnel	57
III.C.2 Dynamique spatiale et temporelle du profil d'expression bi-composante de PD-L1	58
III.C.3 Analyses exploratoires sur la nature et l'effet des macrophages exprimant PD-L1	62
IV. DISCUSSION.....	78
IV.A Performances prédictives du marqueur « PD-L1 tumoral » dans notre série	78
IV.B Algorithme de prédiction proposé.....	80
IV.C Dynamique spatiale et temporelle du profil d'expression bi-composante de PD-L1	81
IV.D NRAS et immunothérapie	82
IV.E NRAS et macrophages	83

V. CONCLUSION	84
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	85

I. INTRODUCTION

I.A Mélanome et système immunitaire

I.A.1 Immunogénicité des cancers en général et du mélanome en particulier

I.A.1.1 Théorie de l'immunosurveillance et notion d'antigènes tumoraux

Le concept d'immunosurveillance a été décrit pour la première fois par Ehrlich en 1909 qui suggéra que les cellules tumorales étaient en permanence reconnues et éradiquées par le système immunitaire avant même que toute manifestation clinique apparaisse. Ce concept fut redéfini, dans les années 1950, par Burnet¹ qui confirma l'idée selon laquelle les lymphocytes pouvaient agir comme des sentinelles capables d'identifier et détruire toute cellule transformée. Dans les années 90, la caractérisation des néo-antigènes tumoraux et la découverte de l'auto-immunité vint compléter la théorie de Burnet. A la lumière de ces découvertes, les années suivantes furent marquées par l'essor de multiples stratégies visant à stimuler la réponse immunitaire antitumorale (vaccination, traitements par interleukines ou thérapie cellulaire).

Dans ce contexte, le mélanome a été l'une des tumeurs à susciter le plus grand engouement du fait de son caractère hautement immunogène comme en témoignent :

- L'existence de phénomènes de régression spontanée², marqués à l'examen anatomopathologique par la présence d'un infiltrat lymphocytaire T³ et qui explique au moins partiellement la survenue de métastases de mélanome de primitif inconnu.
- l'augmentation de l'incidence et le pronostic défavorable du mélanome chez les patients immunodéprimés^{4,5}.
- L'association entre auto-immunité et survie chez les patients atteints de mélanome réséqué⁶.
- le vitiligo comme un facteur pronostic favorable chez les patients porteurs d'un mélanome⁷⁻⁹.
- l'identification de lymphocytes T circulants capables de reconnaître spécifiquement des antigènes tumoraux associés au mélanome¹⁰.
- l'existence d'une corrélation entre la densité de l'infiltrat lymphocytaire tumoral (« tumor infiltrating lymphocyte TIL ») et la survie. Les patients ayant un infiltrat diffus (« brisk ») survivant 1 à 3 fois plus longtemps que les patients sans infiltrat¹¹.

Cependant, malgré un effort de recherche important, aucun des concepts de vaccination, de traitement par les interleukines ou par la thérapie cellulaire n'a abouti à une amélioration significative du pronostic du mélanome métastatique.

I.A.1.2 Les limites de l'immunosurveillance : l'immunoediting

L'échec des stratégies d'immunothérapie conventionnelle et le développement de tumeurs chez des sujets immunocompétents attestaient de l'incapacité pratique du système immunitaire à reconnaître et éliminer en permanence toute cellule transformée. Le concept d'immunosurveillance semblait alors insuffisant, à lui seul, pour expliquer les interactions système immunitaire-cellules tumorales.

Une découverte déterminante va alors élargir le concept d'immunosurveillance à celui d'immunoediting. Dans une étude publiée en 2001, Shankaran et coll¹² démontrèrent que les tumeurs qui se développaient au contact d'un système immunitaire non déficient étaient moins immunogéniques que celles qui se développaient chez des souris immunodéficientes (Figure 1). Cette observation suggéra que les tumeurs issues d'hôte immunodéprimé étaient peu modifiées par le système immunitaire et donc fortement immunogènes tandis que les tumeurs issues d'hôtes immunocompétents avaient « muté » afin d'échapper à la reconnaissance immunitaire antitumorale.

Ainsi, l'idée selon laquelle le système immunitaire ne protège pas seulement contre la formation de tumeur mais façonne également leur immunogénicité est à la base du concept d'immunoediting. En plus de prévenir leur développement, le système immunitaire, paradoxalement, le favorise en générant une pression de sélection favorable à des mutants résistants. Il est probable que ce phénomène survienne de façon continue néanmoins l'effet majeur du processus semble prédominer lors de la phase précoce de la croissance tumorale, quand la tumeur est histologiquement, mais non cliniquement, détectable. Il en résulte que l'immunogénicité de la plupart des tumeurs diagnostiquées a déjà été altérée.

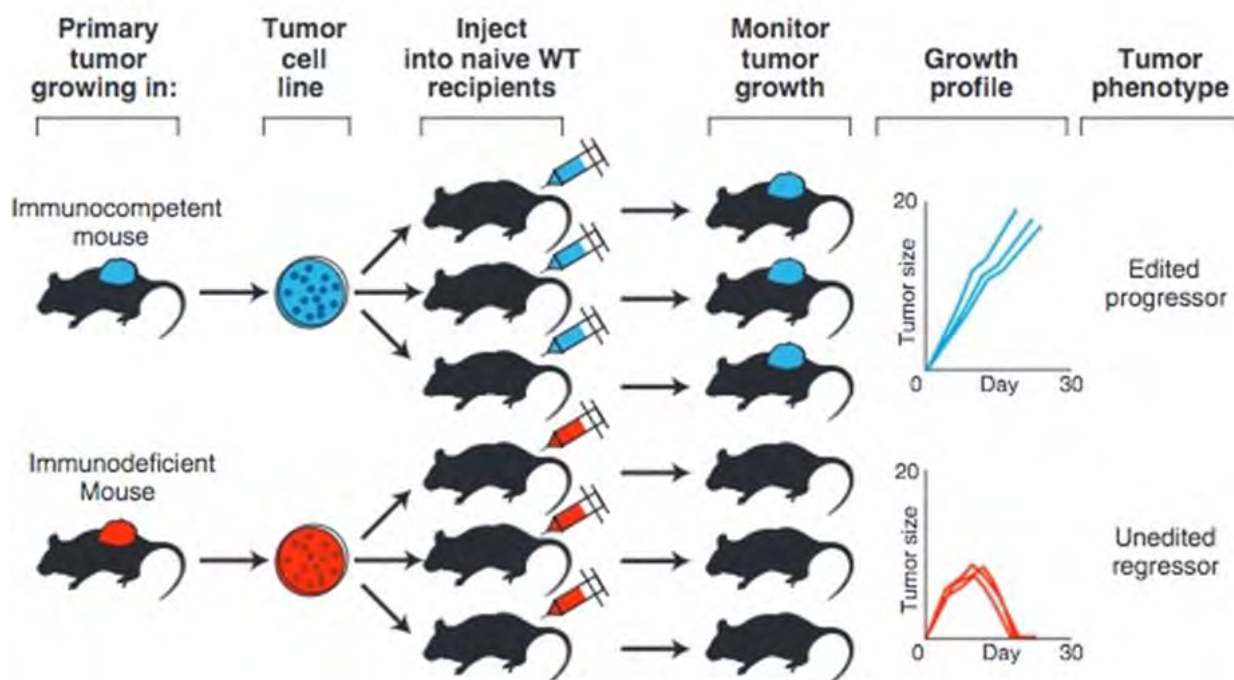


Figure 1. Les tumeurs développées chez des souris immunocompétentes sont qualitativement différentes de celles développées chez des souris immunodéficientes. L'injection de lignées cellulaires tumorales issues de souris immunocompétentes (IC) chez des souris IC sauvages (WT) donne naissance à une tumeur (bleu). En revanche les lignées cellulaires tumorales issues de souris immunodéficientes (ID) injectées à ces mêmes souris IC sauvages sont détruites par le système immunitaire du fait de leur forte immunogénicité (rouge). D'après Schreiber et al, cancer immunoediting : integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion Science 2011¹³

L'immunoediting est donc un processus dynamique impliquant à la fois le système immunitaire inné et adaptatif et caractérisé par trois phases (figure 2) :

- élimination,
- équilibre,
- échappement.

Des facteurs externes peuvent influencer la dynamique du processus.

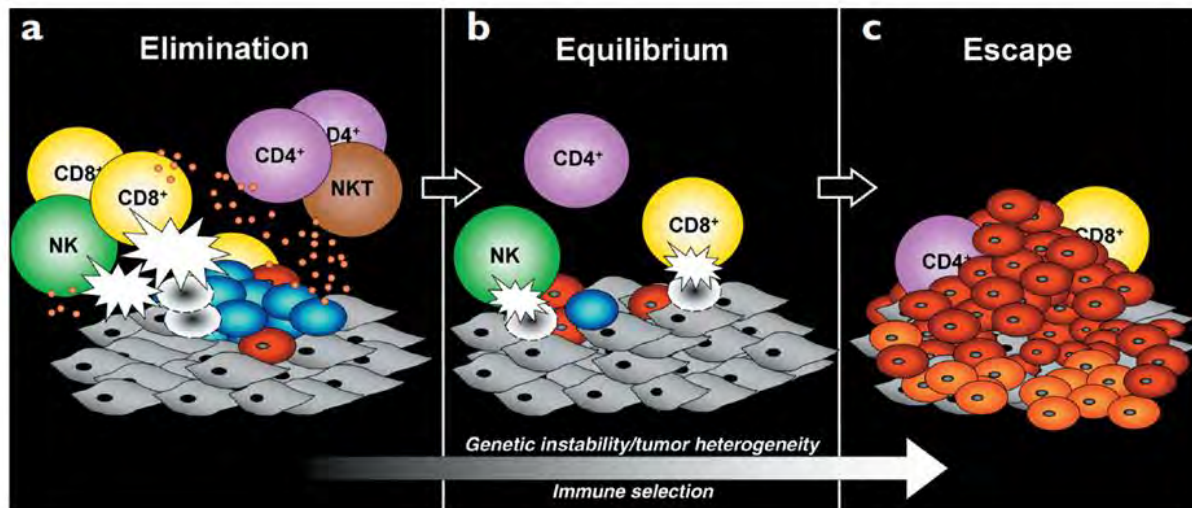


Figure 2. Les trois phases de l'immunoediting : **a.** Elimination = immunosurveillance ; **b.** équilibre : processus par lequel le système immunitaire sélectionne et favorise la génération de cellules tumorales ayant la capacité de survivre à une attaque immunitaire ; **c.** échappement : la tumeur finit par échapper au système immunitaire. Cellules tumorales en développement (bleues), variants tumoraux résistants (rouges), stroma et cellules saines (grises), variants tumoraux résistants additionnels (oranges).

Dunn et al, Cancer immunoediting: from surveillance to tumor escape Nature immunology 2002¹⁴

I.A.1.2.1. Elimination

L'élimination englobe le concept initial d'immunosurveillance, et se caractérise par l'identification et l'éradication des cellules tumorales par le système immunitaire. L'invasion tumorale est responsable de la destruction du tissu sain. Cette destruction à l'origine d'une inflammation locale responsable du recrutement sur le site tumoral de cellules de l'immunité innée (Cellules NK, lymphocytes NK, lymphocytes T $\gamma\delta$, macrophages et cellules dendritiques)¹⁴⁻¹⁶. Les débris cellulaires résultant de l'action des différentes cellules du système immunitaire sont internalisés et processés par les cellules dendritiques qui les transportent vers les ganglions lymphatiques afin de stimuler, par une présentation de peptides immuns sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, les lymphocytes T qui vont, à leur tour, se rendre sur le site tumoral.

L'immunité adaptative est alors enclenchée. Si la tumeur initiale est totalement détruite, l'élimination est la phase finale du processus d'immunoediting.

I.A.1.2.3. Echappement

L'échappement est la phase finale de la progression tumorale. Les cellules tumorales survivantes les plus agressives et les moins immunogènes vont alors se multiplier de façon incontrôlée et aboutir à la maladie cancéreuse cliniquement décelable.

I.A.2 Le paysage immunitaire des cancers en général et du mélanome en particulier

Le concept d'immunosurveillance a permis de comprendre le pronostic globalement favorable lié aux infiltrats lymphocytaires en particulier T CD3+, CD8+ cytotoxiques et T CD45RO+ mémoire, qui sont corrélés à une augmentation de la survie sans récidive et de la survie globale dans quasiment tous les cancers²⁴. Dans certains cancers au premier rang desquels le cancer colorectal, l'infiltrat lymphocytaire T est d'ailleurs en train de revêtir une importance pronostique majeure, qui pourrait à terme détrôner la classification TNM^{25,26}.

Le concept d'immunoediting a quant à lui permis de comprendre que dès lors que la tumeur se développe, elle est envahie par de multiples acteurs du système immunitaire qui vont façonner son micro-environnement, et subir les conséquences d'une interaction cellulaire réciproque avec les cellules tumorales pouvant aboutir à une modification des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de chacun des acteurs, immunologiques compris.

La transition entre phase d'élimination et phase d'équilibre, puis entre phase d'équilibre et échappement, repose sur l'équilibre et le déséquilibre de multiples balances, de natures variées, mettant en jeu et opposant différents effecteurs et régulateurs de la réponse immunitaire antitumorale : à l'échelle cellulaire (cellules immunitaires immunosuppressives et lymphocytes T effecteurs CD8), à l'échelle moléculaire extracellulaire (cytokines protumorales et antitumorales), et à l'échelle moléculaire membranaire (molécules de costimulation et coinhibition appartenant à la famille des checkpoints immunologiques)²⁷.

I.A.2.1. Le micro-environnement cellulaire

I.A.2.1.1 Les lymphocytes infiltrant la tumeur (« Tumor Infiltrating Lymphocytes »)

Le terme TIL pour « Tumor Infiltrating Lymphocyte », fait référence aux lymphocytes infiltrant les tumeurs plus ou moins directement en contact avec les cellules tumorales²⁸. Ce terme a pour la première fois été utilisé par Wallace Clark en 1989, qui en a fait la 1^{ère} classification. Cette classification reste actuellement la plus utilisée pour caractériser et quantifier les TIL²⁹. Elle distingue infiltrat TIL abondant (« brisk ») et infiltrat TIL non abondant (« non brisk »). Clemente a par la suite précisé les infiltrats TIL « brisk », les subdivisant en infiltrat « brisk périphérique » et infiltrat « brisk diffus »³⁰.

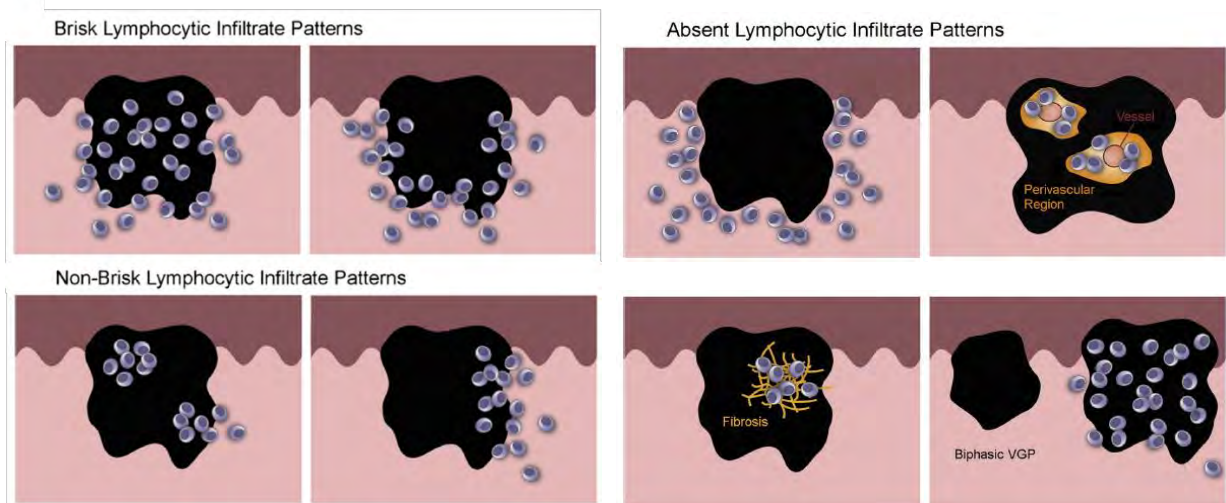


Figure 4. Différents profils d'infiltration lymphocytaire d'un mélanome cutané en phase de croissance verticale D'après Lee et al. Pathology 2016. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer therapy.²⁸

La preuve ultime du rôle favorable joué par les TIL a été apportée par certains succès thérapeutiques des thérapies cellulaires avec transfert adoptif de TIL autologues³¹⁻³⁶. Mais les TIL sont très hétérogènes, contenant différentes populations lymphocytaires pouvant avoir des effets antagonistes. C'est pourquoi les protocoles de Transfert Adoptif de Cellules (TAC) ont nécessité de nombreuses mises au point, pour favoriser l'activité préférentielle des lymphocytes T CD8 cytotoxiques anti-tumoraux. Dans de nombreux protocoles de TAC, l'infusion de TIL autologues est associée à un traitement par IL2, favorisant des cellules T CD8 présélectionnées, dirigées contre les antigènes tumoraux, et CD4 avec un profil de sécrétion cytokinique de type Th1, et est réalisée après une chimiothérapie à visée lymphodéplétive d'éventuels lymphocytes T tolérogènes (de type T régulateurs par exemple)³¹⁻³⁶.

I.A.2.1.2 Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques

Une forte infiltration intra-tumorale en lymphocytes T CD8+ cytotoxiques est corrélée à une survie sans récurrence prolongée et un accroissement de la survie globale de façon quasi-constante quel que soit le type de tumeur analysée²⁵. Seuls les cancers du rein semblent faire exception, une valeur pronostique positive n'étant retrouvée que si l'on prend en compte les lymphocytes T CD8 prolifératifs³⁷.

Dans les mélanomes métastatiques, la présence de lymphocytes T CD8+ spécifiques d'antigènes associés au mélanome (tels que l'antigène Melan-A/MART-1) est associée à une survie sans progression et une survie globale augmentées³⁸. Cependant, une dissociation concernant les lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes de mélanome a été plusieurs fois rapportée. Elle est observée entre l'activité majeure du contingent circulant, capable de générer de grosses réactions inflammatoires, et l'inactivité relative du contingent micro-environnemental, beaucoup plus tolérante.^{39,40}

Cette inactivation des lymphocytes T CD8 au niveau du site tumoral est liée au micro-environnement immunosuppresseur local, impliquant notamment l'expression de checkpoints immunologiques inhibiteurs (cf. infra)⁴¹ caractérisant le phénotype lymphocytaire « épuisé » (« exhausted »). De façon intéressante, cette inactivité locale des cellules T CD8 est réversible, lorsque ces dernières sont retirées du micro-environnement tumoral : ceci a été montré in vitro⁴², mais également en thérapeutique, notamment avec les inhibiteurs de checkpoints immunologiques dont les anti-PD-1 (cf. infra).

I.A.2.1.3 Les lymphocytes T CD4 (Th1, Th2 et Th17)

Le rôle des lymphocytes T CD4 dans la réponse immunitaire antitumorale reste actuellement controversé. Le terme « lymphocytes T CD4 » fait essentiellement référence aux lymphocytes T helpers (Th), schématiquement répartis en lymphocytes Th1 et Th2, selon leurs profils de sécrétion cytokinique. Les lymphocytes Th1 auraient un effet antitumoral médié par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques qu'ils stimulent⁴³. Des travaux plus récents suggèrent un effet antitumoral direct des lymphocytes T CD4, qui serait, dans certaines conditions, supérieur à celui des CD8 cytotoxiques⁴⁴. L'inhibition du checkpoint immunologique CTLA-4 exprimé par les CD4 favoriserait la réponse effectrice et la régression tumorale⁴⁵. Par ailleurs, une nouvelle entité a récemment été décrite au sein des lymphocytes CD4, caractérisée par la production d'IL17, nommée Th17, qui aurait une activité antitumorale en particulier dans le mélanome⁴⁶.

I.A.2.1.4 Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs sont un sous-type de lymphocytes T CD4+, caractérisés par l'expression membranaire de CD25 (sous unité alpha du récepteur à l'IL2), et l'expression du facteur de transcription FoxP3⁴⁷. Ils se développent dans le thymus et sont responsables de la tolérance du soi et de la prévention des réactions auto-immunes. Une augmentation du taux de lymphocytes T régulateurs a été décrite dans le sang circulant des patients atteints de mélanomes⁴⁸; la présence de T régulateurs a été constatée dans des mélanomes primitifs et les métastases ganglionnaires⁴⁸. Le contact avec les antigènes de mélanome (gp100 et des antigènes de différenciation) induit l'expression de FoxP3 et la production d'IL10 par les T régulateurs⁴⁹; de plus les T régulateurs inhiberaient directement les lymphocytes T CD4+CD25- de manière contact-dépendante, et inhiberaient la production de cytokines et la prolifération des lymphocytes T CD8+ dans les ganglions de patients atteints de

mélanomes⁴⁹. Enfin, les lymphocytes T régulateurs seraient en cause dans les échecs thérapeutiques de l'IL-2, stimulant aussi bien les lymphocytes effecteurs anti-tumoraux que les lymphocytes T régulateurs protumoraux⁵⁰. Les lymphocytes T régulateurs sont une des cibles importantes des inhibiteurs du checkpoint immunologique CTLA-4⁵¹, dont l'efficacité semble potentialisée par les inhibiteurs de CD25⁵².

I.A.2.1.5 Les cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (NK) constituent avec les lymphocytes T effecteurs (CD4 Th1 et CD8) les deux piliers majeurs de l'immunosurveillance antitumorale. Elles sont maintenant définies comme des cellules lymphoïdes innées de type 1⁵³. Comme pour les lymphocytes T effecteurs, l'infiltration tumorale par les lymphocytes NK est associée à un bon pronostic dans de nombreux cancers dont les mélanomes⁵⁴. L'infiltration par les cellules NK a de plus été corrélée aux phénomènes de régression tumorale dans les mélanomes primitifs et les naevi⁵⁵. Les lymphocytes T effecteurs et NK sont complémentaires à plusieurs égards dans la réponse immunitaire antitumorale. Cette complémentarité est temporelle, spatiale et fonctionnelle : les NK reconnaissent les signaux de stress ou de danger lors de la réponse immunitaire innée précédant la réponse immunitaire adaptative par les lymphocytes T effecteurs spécifiques des antigènes tumoraux⁵⁶. Les NK ont une fonction cytotoxique (peuvent lyser les cellules tumorales sans immunisation préalable), et sécrétrice de cytokines (IFN gamma, TNF alpha, GM-CSF...) facilitant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (effet autocrine sur les NK et effet paracrine sur les macrophages anti-tumoraux de type M1 et sur les lymphocytes T CD8 cytotoxiques)⁵⁶. Les répertoires sont différents (non redondant) : les cellules tumorales ciblées par les lymphocytes T CD8 et NK selon l'expression ou non des molécules du CMH de classe I ne sont pas les mêmes. Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes tumoraux présentés par les molécules du CMH de classe I, or la perte d'expression du CMH de classe I constitue un mécanisme d'immuno-échappement tumoral fréquemment rencontré dans les mélanomes⁵⁷. Les cellules NK sont au contraire activées par la perte du CMH de classe I marquant le soi « normal » (« missing self recognition », entraînant une levée de l'inhibition exercée par les molécules du CMH de classe I sur les récepteurs KIR⁵⁸. Enfin, il y a synergie des lymphocytes T effecteurs et NK de par la sécrétion de cytokines à effet auto- et/ou paracrine (notamment, IL-2 sécrété par les LT, stimulant LT et NK, et IFN gamma sécrété par les NK et les LT CD8+ stimulant les LT CD8+). Dans le mélanome, une complémentarité a été observée entre l'activité des cellules NK circulantes et intensité de l'infiltration lymphocytaire observée dans les mélanomes primitifs. De plus, comme pour les lymphocytes T intra-tumoraux ayant un phénotype « épuisé », des altérations phénotypiques et fonctionnelles sont fréquemment retrouvées parmi les lymphocytes NK intra-tumoraux, traduisant l'immunoediting exercé par la tumeur en réponse à la pression de sélection immunitaire⁵⁹⁻⁶⁰. Les mécanismes le plus souvent décrits dans les mélanomes métastatiques mettent en jeu un déséquilibre de la balance entre récepteurs activateurs (NKG2D, NKp46, DNAM) et récepteurs inhibiteurs des NK, au profit de ces derniers^{54,61}.

I.A.2.1.6 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les effecteurs du versant humoral de la réponse immunitaire adaptative. Leur fonction principale est la production d'anticorps antigène-spécifiques après différenciation en plasmocytes. Ils peuvent également se comporter comme cellules présentatrice de l'antigène (CPA). Leur présence dans le micro-environnement tumoral a

une valeur pronostique variable en fonction des cancers étudiés. Dans les mélanomes, ils sont le plus souvent associés à un bon pronostic⁶². Les lymphocytes B exprimant la molécule de costimulation CD80 favoriseraient notamment la polarisation Th1 des lymphocytes CD4 et donc la production de cytokines Th1 à effet anti-tumoral⁶³. Les lymphocytes B présentent également, comme les lymphocytes T effecteurs et NK, des altérations phénotypiques et fonctionnelles traduisant l'immunoediting exercé par la tumeur sur le système immunitaire : diminution du nombre de lymphocytes B mémoires, et hyporéactivité⁶⁴. Contrastant avec l'ensemble de ces éléments, quelques publications suggèrent à l'inverse un rôle protumoral des lymphocytes B dans le mélanome, via l'interaction avec MUC18⁶⁵, une molécule d'adhésion favorisant la croissance tumorale et la dissémination métastatique d'une part, et via la polarisation Th2 du micro-environnement tumoral⁶⁶.

I.A.2.1.7 Les macrophages M1 et M2

Les macrophages associés aux tumeurs (ou « TAM » pour « Tumor Associated macrophages ») constituent la majorité des cellules immunitaires du micro-environnement tumoral. Ils ont longtemps été sous-estimés, en raison de difficultés techniques de visualisation (peu rehaussés par la coloration Hémalum-Eosine standard) et d'identification (confusion possible avec les cellules tumorales en raison des atypies cytonucléaires parfois présentes). Les TAM étaient initialement présumés anti-tumoraux⁶⁷, en raison de leurs fonctions d'« éboueurs » de l'organisme (« scavenger »), et de cellules présentatrices de l'antigène. Il faut en réalité schématiquement distinguer deux types de TAM :

-les macrophages de type M1, de « phénotype activé classique », présentant un effet anti-tumoral, car favorisant une production cytokinique de type Th1, et globalement les fonctions lytiques du système immunitaire (« fonction KILL » des macrophages de type M1 décrits par C. Mills)⁶⁸,

-et les macrophages de type M2, de « phénotype activé alternatif », présentant un effet protumoral, immunosuppresseur et proangiogénique, favorisant une production cytokinique de type Th2 et les fonctions réparatrices et pro-survie des cellules environnantes (« fonction REPAIR » des macrophages M2 décrits par C. Mills)⁶⁸.

Différentes études phénotypiques et fonctionnelles révèlent que la majorité des TAM sont en réalité de type M2, concordant avec la valeur pronostique péjorative qui leur est actuellement le plus souvent conférée⁶⁹. La plupart des études identifiant et dénombrant les TAM reposaient initialement sur un immunomarquage CD68, marqueur pan-macrophagique. CD204 et CD163 sont plus caractéristiques des macrophages de type M2 et sont devenus les marqueurs de référence pour les identifier⁶⁹. CD163 est un récepteur « scavenger » de l'hémoglobine, qui a également une fonction proangiogénique, immunosuppressive et de régulation de la réponse inflammatoire, avec in fine un effet protumoral. Dans les mélanomes, les TAM de type M2 ont été associés à un mauvais pronostic à tous les stades évolutifs (primitif, évolution locorégionale et métastatique à distance)⁷⁰⁻⁷³. Par ailleurs, Mansfield et coll. ont suggéré leur rôle dans la constitution d'une niche pré-métastatique, en montrant la présence d'un gradient de TAM dans les ganglions de drainage des mélanomes primitifs : gradient décroissant allant des ganglions métastatiques aux ganglions sentinelles et enfin aux ganglions non sentinelles non envahis⁷⁴. A l'inverse, les macrophages CD163+ des sinus ganglionnaires, physiologiquement présents en faible abondance, auraient un rôle positif de défense antitumorale⁷⁵. Dans les mélanomes, leur présence dans les ganglions

envahis locorégionaux est en effet associée à une densité élevée de T CD8 et à une survie globale augmentée⁷⁵. Ils seraient par ailleurs stimulés par l'IFN alpha⁷⁵.

Les macrophages de type M2 seraient impliqués dans le processus métastatique par différents mécanismes :

- Création d'un environnement cytokinique protumoral constituant une niche prémétastatique⁷⁶⁻⁷⁸, contenant en abondance : TNF alpha, TGF bêta et VEGF ; ces deux dernières cytokines peuvent également être produites par les cellules tumorales, générant un cercle vicieux.

- Stimulation directe de la croissance tumorale : via la production de TGF bêta, et indirecte : via la sécrétion de facteurs proangiogéniques et immunosupresseurs (VEGF, IL10, IDO, PGE2...) favorisant la néo-angiogenèse et l'induction de lymphocytes T régulateurs⁷⁹⁻⁸⁰. Les macrophages de type M2 peuvent également inhiber les lymphocytes T CD8 cytotoxiques par divers mécanismes dont l'expression de checkpoints immunologiques tels que PD-L1 et PD-L2⁸¹⁻⁸². Dans certains cancers comme les cancers colorectaux avec instabilité microsatellitaire, la « source » principale de PD-L1 est d'ailleurs d'origine macrophagique⁸³.

- Ils seraient également peut-être directement impliqués dans la dissémination métastatique lors de phénomènes de fusions cellulaires entre macrophages et cellules tumorales de mélanome⁸⁴. Cette théorie alternative à celle la transition épithélio-mésenchymateuse décrite dans les carcinomes, a été évoquée devant la présence de cellules tumorales présentant des marqueurs membranaires macrophagiques au niveau du front d'invasion tumoral et dans le sang périphérique de patients atteints de mélanomes⁸⁴. Elle est cependant controversée, l'autre hypothèse étant celle d'une plasticité phénotypique, avec sélection, comme cela a pu être observé sous pression de sélection thérapeutique en cas de résistances, de cellules de mélanome exprimant des marqueurs membranaires macrophagiques les protégeant de la lyse macrophagique, délivrant un signal « do not eat me » décrit par C. Mills⁸⁵.

La déplétion des macrophages M2 a déjà fait l'objet d'études préliminaires dans le mélanome, avec le clodronate liposomal, montrant un effet antitumoral en lien avec une modulation de l'angiogenèse et une diminution des taux sériques d'IL10 et de TNF alpha⁸⁶. Les macrophages de type M2 sont actuellement « ciblables » par des molécules plus abouties : inhibiteurs du récepteur CSF1R (anticorps monoclonal ou inhibiteurs du domaine kinase) qui vont prochainement faire l'objet d'essais cliniques en combinaison avec les inhibiteurs de checkpoints^{87,88}.

Enfin, dans un essai de phase I/II, Weber et coll. rapportent qu'une augmentation du taux de MDSC (« Myeloid Derived Suppressor Cells, qui constituent un autre type de cellules myéloïdes suppressives, moins différenciées que les macrophages de type M2), serait associée à une survie diminuée chez les patients ayant un mélanome métastatique traité par Nivolumab en 2^{ème} ligne après Ipilimumab⁸⁹.

I.A.2.1.8 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques matures jouent un rôle central dans la réponse immunitaire antitumorale, en tant que cellules présentatrices de l'antigène⁹⁰ et cellules sécrétrices d'IL2 favorisant l'activité cytotoxique antitumorale des lymphocytes T CD8 cytotoxiques et des cellules NK⁹⁰. Une altération phénotypique et fonctionnelle des cellules dendritiques a été décrite dans le mélanome, notamment dans les ganglions sentinelles, où leur nombre est augmenté, mais les cellules dendritiques plasmacytoïdes s'y trouvant sont déficientes notamment par perte de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86⁹¹.

I.A.2.2. Les checkpoints immunologiques

I.A.2.2.1 Rôle des molécules de costimulation et coinhibition dans l'activation

lymphocytaire

La réponse immunitaire adaptative est initiée lors de la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T via leur récepteur TCR (T Cell Recepteur), ce qui constitue le signal 1. L'antigène est exposé par les Cellules Présentatrices de l'Antigène (CPA) via une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) entraînant l'activation, la différenciation et l'expansion clonale du lymphocyte T. Cette communication entre CPA (ou cellule tumorale) et lymphocyte T est modulée par des co-sigaux activateurs ou inhibiteurs (encore appelés rétrocontrôles inhibiteurs) transduits en aval de récepteurs activés par des ligands membranaires ou solubles et représentent ce que l'on appelle les synapses ou checkpoints immunologiques (signal 2)⁹². Ces ligands/récepteurs font partie des superfamilles des immunoglobulines et des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNF)⁹². L'expansion du lymphocyte T aboutira notamment à la production de cytokines, l'interleukine 2 (IL2) en particulier (signal 3).

Les molécules de costimulation/coinhibition ou checkpoints immunologiques sont un ensemble de récepteurs et ligands dont le rôle est de moduler l'activation et d'orienter les réponses des lymphocytes T effecteurs (Figure 5).

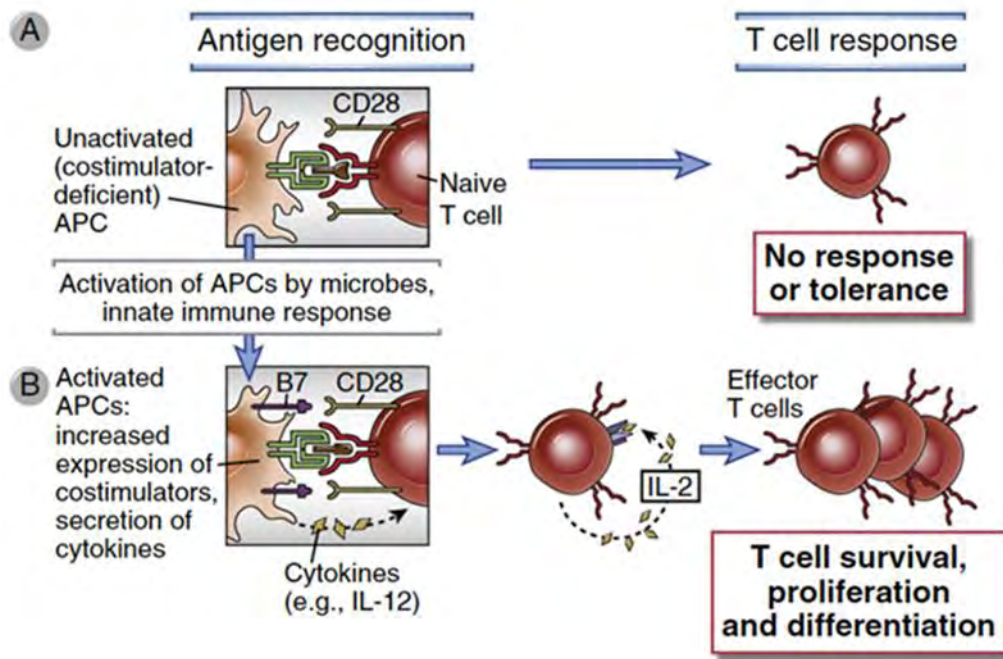


Figure 5. Fonctions des molécules de costimulation sur l'activation cellulaire T. **A.** L'absence ou le nombre insuffisant de molécules de costimulation exprimés par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) à l'état de repos empêche toute activation lymphocytaire (anergie). **B.** Les pathogènes et cytokines issues de l'activité de l'immunité innée stimulent l'expression par les CPA, de molécules de costimulation dont les molécules B7. Les CPA sont alors capables d'activer les lymphocytes T naïfs. Abbas et coll. Cellular immunology Eighth edition.

Les mieux définies pour les lymphocytes T sont deux protéines apparentées : B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86)⁹³⁻¹⁰¹, elles sont reconnues par le récepteur CD28 exprimé par tous les lymphocytes T. Les signaux provenant de la liaison du CD28 aux protéines B7 agissent conjointement aux signaux générés par la reconnaissance du complexe CMH-Ag/TCR et sont nécessaires pour initier les réponses des lymphocytes T naïfs. En l'absence d'interaction entre CD28 et B7, l'engagement CMH-Ag/TCR isolément conduit à une absence de réponse des lymphocytes (anergie).

L'homéostasie immunitaire dépend de l'intégration de ces multiples signaux co-activateurs et co-inhibiteurs, dans un fonctionnement comparable aux mécanismes d'activation ou d'inhibition des neurones du système nerveux central. Chaque étape constitutive de l'immunité T cellulaire médiée par le trio TCR - Antigène – molécule du CMH (sélection clonale de cellules spécifiques de l'antigène, activation, prolifération dans les organes lymphoïdes secondaires, acheminement aux sites antigéniques et inflammatoires, exécution de fonctions effectrices directes ou auxiliaires, via la sécrétion de cytokines et l'expression de ligands membranaires) est régulée en permanence, permettant la mise en place de réponses immunitaires efficaces en présence de pathogènes reconnus comme non-soi ou soi transformé, tout en maintenant une tolérance du soi. Il y a une tolérance centrale, prohibant très précocement les réponses immunitaires dirigées contre le soi, lors de leur mise en place

dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions ; et une tolérance périphérique, empêchant une hyperactivation immune inappropriée en intensité et/ou en durée dont l'hyperinflammation associée pourrait endommager les tissus sains avoisinants.

L'expression des checkpoints est dérégulée dans les cancers, constituant un mode de résistance à l'immunité de l'hôte¹⁰². Ce phénomène, particulièrement étudié pour l'hyperexpression de PD-L1, est nommé « résistance immune » et se subdivise en « résistance immune adaptative » et « résistance immune innée », selon le mécanisme entraînant la surexpression du checkpoint quand elle est présente.

Ainsi, les tumeurs détournent les régulateurs négatifs physiologiques de la réponse immunitaire pour échapper au système immunitaire de l'hôte, lors de phénomènes qui participent à l'immuno-échappement, dernière phase de l'immunoediting.

I.A.2.2.2 CTLA4

L'un des premiers checkpoints décrits est CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-Associated antigen-4), régulateur négatif de l'activation lymphocytaire dont le rôle physiologique est de maintenir la tolérance centrale, en inhibant les clones T auto-réactifs, et les clones T inutiles à l'éventuelle réponse immunitaire en cours. CTLA-4 est impliqué dans la « gestion du répertoire des clones T » lors de la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique adaptative dans les organes lymphoïdes secondaires¹⁰³. CTLA-4 régule l'amplitude de la réponse T lors des phases d'activation précoces de la cellule T. Il est également impliqué dans l'activation des lymphocytes T régulateurs, qui expriment CTLA-4 de façon constitutive. CTLA-4 a donc à la fois, un effet inhibiteur des lymphocytes T effecteurs (CD8 cytotoxiques et CD4 helper) et un effet activateur des lymphocytes T régulateurs.

CTLA-4 est une molécule appartenant à la superfamille des immunoglobulines^{104,105}. Son rôle dans la régulation négative de l'activation lymphocytaire a été démontré par l'utilisation d'anticorps monoclonaux et l'étude des souris déficientes en CTLA-4. Ces dernières décèdent rapidement maladies auto-immunes sévères secondaires à la prolifération massive et l'infiltration multi-organique de lymphocytes T autoréactifs^{106,107}.

L'expression du CTLA-4 est inductible sur les lymphocytes T CD4 ou CD8 naïfs n'ayant pas encore rencontré l'antigène, lors des phases d'activation précoces de « priming lymphocytaire » dans les organes lymphoïdes secondaires. L'expression de CTLA4 est induite après la phase d'activation initiale, et vient réguler l'effet activateur de CD28 en se liant de façon compétitive avec les ligands activateurs de ce dernier, avec une affinité plus forte, délogeant CD28.

L'expression du CTLA-4 est constitutive sur les lymphocytes T régulateurs, CTLA-4 étant un gène cible du facteur de transcription FoxP3¹⁰⁸.

Le CTLA-4, lie via son domaine extracellulaire, les protéines B7 (CD80 ou B7-1 et CD86 ou B7-2), avec une plus forte affinité que le CD28^{109,110}. De manière à respecter un rôle de régulateur négatif permettant un rétro-contrôle de l'activation lymphocytaire, l'expression du CTLA-4 n'est pas constante, et ne survient chez les lymphocytes T effecteurs qu'après leur activation, alors que sur les lymphocytes T régulateurs il est exprimé de façon constitutionnelle^{107,111}.

Les mécanismes précis par lesquels le CTLA-4 exerce son activité inhibitrice sont toujours discutés. Deux mécanismes sont évoqués :

- Une activité inhibitrice directe sur les T effecteurs (cellulaire intrinsèque -cis)
- et indirecte via les T régulateurs et les cellules présentatrices d'antigènes (cellulaire extrinsèque-trans)¹¹².

Les inhibiteurs de CTLA-4 induiraient l'activation des lymphocytes T effecteurs via deux mécanismes : d'une part en inhibant l'effet immunosuppresseur direct de CTLA-4 à la surface des lymphocytes T effecteurs, d'autre part en inhibant les lymphocytes T régulateurs qui l'expriment de façon constitutive.

I.A.2.2.3 PD-1 et ses ligands, PD-L1 et PDL2

La voie du Programmed cell Death protein 1 (PD-1 ou CD279) est un autre rétrocontrôle négatif qui a la particularité d'agir au niveau des tissus périphériques et donc du micro-environnement tumoral¹¹³⁻¹¹⁶. Alors que CTLA-4 régule le priming du lymphocyte T, PD-1 agit au niveau de l'activation d'un lymphocyte T précédemment primé, lors de sa phase effectrice après reconnaissance de l'antigène dont il est spécifique. L'effet est complémentaire de CTLA-4¹¹⁷⁻¹¹⁸.

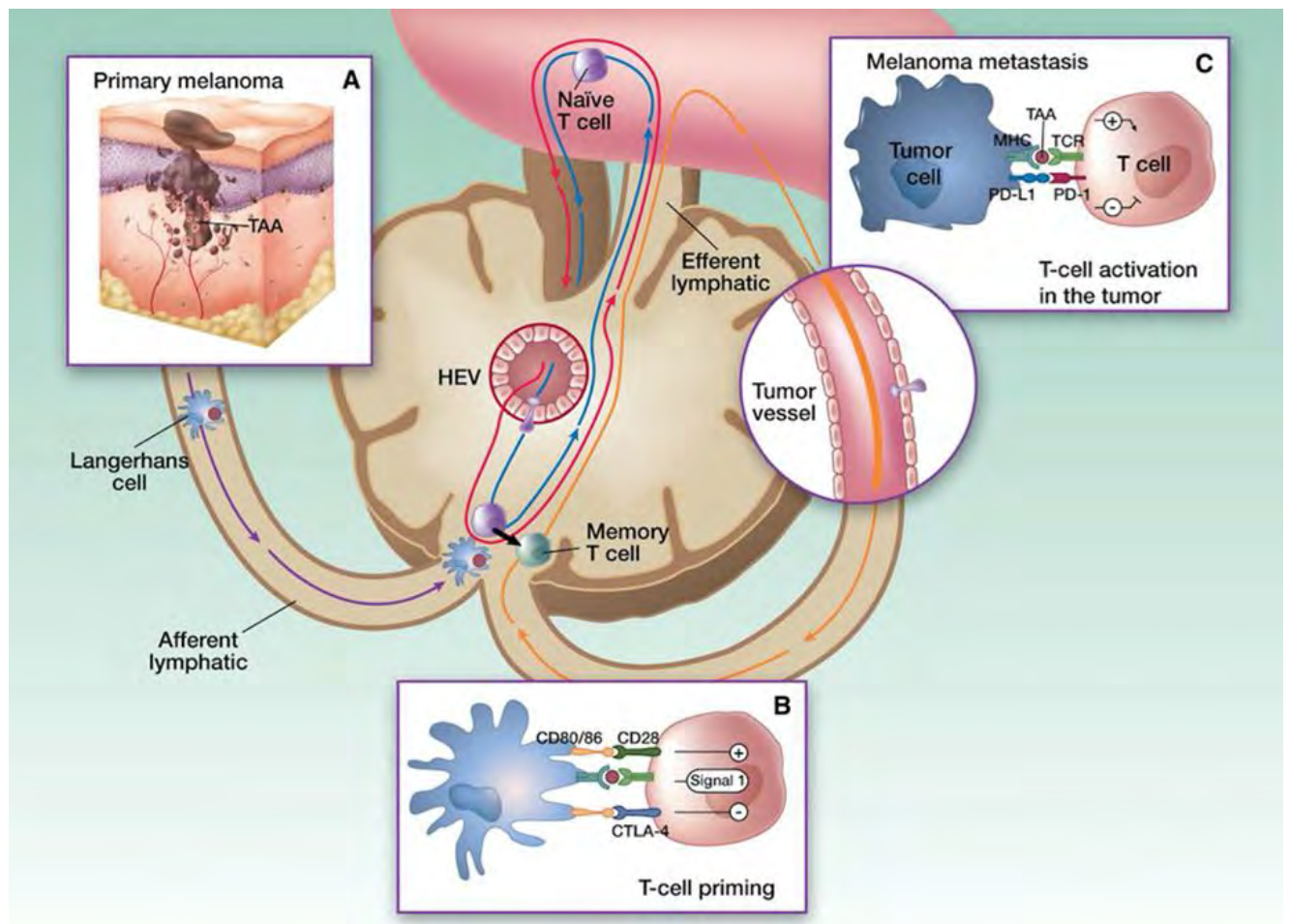


Figure 6. Deux sites d'action distincts pour CTLA-4 et PD-1.

A. Après apprêtement des antigènes tumoraux (TAA), les cellules de Langerhans et autres cellules présentatrices de l'antigène migrent vers les ganglions lymphatiques jusqu'au premier ganglion de la zone de drainage (ganglion sentinelle) afin de présenter les TAA aux lymphocytes T naïfs. **B.** Lorsqu'un TAA est présenté à une cellule T correspondante, l'activation complète de ce dernier nécessite un premier signal médié par le TCR et un deuxième signal dit de costimulation via l'interaction CD28-CD 80/86 (B7). L'activation peut être interrompue lorsqu'un troisième signal médié par l'interaction entre le CTLA-4 et CD 80/86 (B7) est mis en jeu, ce phénomène survenant 24-48 heures après amorçage des lymphocytes T. **C.** En cas d'activation complète, le lymphocyte va alors proliférer et acquérir un phénotype mémoire et différentes molécules d'adhésion lui permettant de rejoindre le site tumoral où il va être en mesure de se réactiver à la suite d'une nouvelle présentation des mêmes TAA. Lorsque la cellule T mémoire est recrutée sur le site tumoral et activée lors d'une nouvelle présentation des TAA, l'activation peut être perturbée par la liaison du PD-1 avec son ligand PD-L1 exprimé par la cellule tumorale de façon constitutionnelle ou dans un contexte d'inflammation.

HEV : high endothelial venule, TAA : tumor-associated antigens. Adapté de Ott et al: CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. Clin Cancer Res 2013.

Tout comme CTLA-4, PD-1 est exprimé par les lymphocytes T effecteurs activés CD8 positifs et CD4 positifs, ainsi que par les lymphocytes T régulateurs, mais il est également exprimé au niveau des cellules NK, des cellules dendritiques, des lymphocytes B et des monocytes¹¹⁹.

PD-1 un récepteur membranaire de la superfamille des immunoglobulines. Le récepteur PD-1 possède deux ligands, le PD-L1 (ou B7-H1 ou CD274) et le PD-L2 (ou B7-DC ou CD273). Ces ligands, en particulier PD-L1, sont exprimés sur une grande variété de cellules, en particulier sur des cellules hématopoïétiques de la lignée myéloïde, et non hématopoïétiques comme les cellules endothéliales et épithéliales (e.g. îlots pancréatiques, neurones, astrocytes...)^{120,121}, où l'expression de PD-L1 est induite en présence de cytokines pro-inflammatoires, essentiellement de type Th1, en particulier l'interféron gamma^{120,121}.

En physiologie, l'expression de PD-L1 est inductible par l'« inflammation » dans un grand nombre de tissus et de types cellulaires, en réaction à une réponse immunitaire de type Th1, notamment suite à la production d'interféron gamma et/ou en aval de la transduction du signal du TCR après l'activation des lymphocytes T effecteurs dans les tissus périphériques, pour maintenir la tolérance immunologique périphérique¹²². Elle constitue un rétrocontrôle négatif de la réponse immunitaire normale, pour y mettre fin, une fois que la clairance antigénique a eu lieu, afin d'éviter une inflammation persistante inappropriée dommageable pour les tissus sains. Elle permet également la modulation précise (« fine tuning ») de la réponse immunitaire¹²³.

A l'inverse, le ligand PD-L2, qui a une affinité de liaison nettement supérieure à PD-L1 pour le récepteur PD-1¹²⁴, a en revanche une expression beaucoup plus restreinte que PD-L1, essentiellement représentée par une expression macrophagique et par les cellules dendritiques¹²⁵, en réponse à un pattern différent de cytokines pro-inflammatoires, préférentiellement de type Th2, telles que l'IL4^{126,127}.

La liaison de PD-1 à l'un de ses deux ligands, PD-L1 ou PD-L2, entraîne l'arrêt du signal de transduction en aval du TCR et empêche l'activation du lymphocyte T ; il limiterait également la durée des contacts intercellulaires entre cellule T et cellule présentatrice de l'antigène ou entre cellule T et cellule tumorale cible¹²⁸. Au niveau des lymphocytes T régulateurs en revanche, la liaison de PD-1 à un de ses ligands, entrainerait au contraire la prolifération lymphocytaire¹²⁹.

Le domaine cytoplasmique de PD-1 contient un motif ITIM (Immunorecepteur Tyrosine based Inhibition Motif) et un motif ITSM (Immunoreceptor Tyrosine based Switch Motif). Ces deux motifs sont phosphorylés après l'interaction de PD-1 avec ses ligands. Une fois phosphorylés, le motif ITSM recrute SHP2 et SHP1. PD-1, localisé à proximité du TCR, induit ainsi la déphosphorylation de CD3ζ, ZAP70, et de PKCθ, inhibant ainsi la voie de signalisation proximale du TCR. PD-1 est aussi capable d'inhiber RAS/ERK par un mécanisme SHP2-indépendant. La modulation de ces voies de signalisations limite l'activation et l'expansion des lymphocytes T¹³⁰⁻¹³².

Contrairement aux souris Knock-Out pour CTLA4 qui meurent en 3 à 4 semaines d'une hyperactivation immunitaire, le phénotype des souris KO pour PD-1, PD-L1 et PD-L2 est viable, mais selon leur background génétique, ces souris souffrent de maladies auto-immunes variées : cardiomyopathie dilatée, syndrome lupique avec arthrite et néphrite, diabète.^{114,115,133} Le blocage de PD-1 entraîne une augmentation de l'activité des

lymphocytes T, mais aussi des lymphocytes NK, et entraîne également une augmentation de la production d'anticorps par la lignée B¹⁰².

PD-1 est fréquemment exprimé par les lymphocytes infiltrant les tumeurs, dans de nombreux cancers¹³⁴, notamment par les lymphocytes T CD8, où la surexpression de PD-1 traduit le plus souvent un état anergique ou « épuisé » (« exhausted »). Les lymphocytes PD-1 positifs produisent notamment moins de cytokines que les lymphocytes PD-1 négatifs¹⁰². Parmi les cellules CD4 positives, la surexpression de PD-1 identifie en général des lymphocytes T régulateurs¹⁰².

D'autres fonctions de l'axe PD-1/PD-L1 ont été décrites dans les cancers, comme l'induction de l'apoptose¹³⁵, première fonction mise en évidence, qui s'est par la suite avérée mineure comparée à l'induction de l'« exhaustion » lymphocytaire. Des phénomènes de compétition métabolique ont également été décrits avec ce checkpoint, permettant de « donner l'avantage » aux cellules tumorales en cycle par rapport aux lymphocytes « épuisés » moins avides^{136,137}. Enfin, des fonctions pro-tumorales directes de PD-L1, indépendantes d'un éventuel effet immunosuppresseur, ont également été décrites¹³⁸.

Dans les cancers, les ligands de PD-1 peuvent être surexprimés par les cellules tumorales elles-mêmes, notamment dans les mélanomes, les cancers ovaires et les cancers bronchiques où ils ont initialement été décrits¹³⁴, en réalité cette liste ne fait que s'étendre... mais également par les cellules du microenvironnement tumoral notamment les cellules de la lignée myéloïde¹³⁹⁻¹⁴¹.

Le rôle physiologique de la voie PD-1, de régulation des réponses effectrices dans les tissus périphériques, est détourné dans les cancers, où la surexpression de PD-L1 rend tolérogènes les lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux dans le microenvironnement tumoral⁴⁰.

L'expression de PD-L1 peut schématiquement être (dé-)régulée de deux façons dans les cancers¹⁴²:

- expression inductible de PD-L1 dans un contexte cytokinique Th1 attestant d'une réponse immunitaire préalable (expression essentiellement induite par l'interféron gamma, via le facteur de transcription NF-kB) : cette boucle de rétrocontrôle physiologique régulant l'amplitude et la durée des réponses immunitaires normales, est détournée et amplifiée de façon inappropriée en contexte tumoral de stimulation antigénique persistante. Cette situation est nommée « résistance immune adaptative ».
- expression constitutive de PD-L1 au sein de voies d'activation oncogéniques : indépendamment d'une éventuelle réponse immunitaire antitumorale. Cette situation est nommée « résistance immune innée ».

L'expression constitutive « d'origine oncogénique » de PD-L1 a pour la première fois été décrite dans le cadre d'une hyperactivation de la voie PI3K-AKT, notamment en cas de délétion ou d'absence d'expression de PTEN dans les glioblastomes¹⁴³, dans le cadre d'une activation constitutive de la tyrosine kinase oncogénique ALK dans certains lymphomes et cancers bronchiques, via une voie de signalisation médiée par STAT3 notamment¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Dans les mélanomes, de multiples publications suggèrent un lien entre l'activation ou l'inhibition de la voie des MAP kinases et l'expression de PD-L1¹⁴⁷, notamment chez les patients traités par inhibiteurs de la voie des MAP kinase de type anti-BRAF et/ou anti-MEK^{148,149}, sans que la nature exacte de cette relation n'ait cependant pu être mise en évidence. La diminution du taux de résistances aux anti-BRAF lors de l'adjonction d'un anti-MEK passerait, non seulement par l'inhibition de la réactivation de la voie des MAP kinases, mais aussi par la diminution de l'expression de PD-L1 médiée par les facteurs de transcription c-Jun et STAT3¹⁵⁰. Il n'est cependant pas démontré de corrélation entre le statut mutationnel BRAF et le profil d'expression de PD-L1¹⁵¹.

Environ 40% des mélanomes surexpriment PD-L1 (avec un seuil fixé à 5% des cellules tumorales)^{142,152-158}. Dans la grande majorité des cas, l'expression de PD-L1 est associée à la présence conjointe d'un infiltrat lymphocytaire T, témoignant donc d'une « résistance immune adaptative »^{156,157}.

Il existe une grande variabilité inter- et intra-patient, de l'expression de PD-L1 selon l'évolution spatio-temporelle de la maladie, et au sein de la maladie métastatique, selon le site métastatique^{156,158}. La variabilité du statut PD-L1 au cours du suivi longitudinal de l'expression tumorale de PD-L1 concerne 50% des 72 patients analysés par Madore et coll.¹⁵⁸ De plus, l'analyse longitudinale de l'expression de PD-L1 par patient, permet de définir le statut PD-L1 d'un patient donné en plus du statut PD-L1 d'un échantillon donné¹⁵⁸. Madore et coll. observent ainsi que 72% des patients sont PD-L1 positifs, si l'on considère qu'ils ont été au moins une fois positifs¹⁵⁸. Ils rapportent en revanche, contrairement à Taube et coll, une meilleure corrélation du profil de réponse aux anti-PD-1 avec le statut PD-L1 du dernier échantillon prélevé avant initiation du traitement¹⁵⁸. Il y a également des observations contradictoires concernant le profil d'expression de PD-L1 selon le site métastatique, une moindre expression de PD-L1 étant rapportée par Kluger et coll. dans les métastases cérébrales et cutanées de mélanome¹⁵⁴, et à l'inverse de Madore et coll, qui décrivent au contraire une expression plus importante de PD-L1 dans ces mêmes localisations, en comparaison avec les localisations viscérales¹⁵⁸, tout comme Berghoff et coll. qui décrivent également une forte expression de PD-L1 dans les métastases cérébrales de mélanomes¹⁵⁹.

La valeur pronostique de l'expression de PD-L1 est très variable en fonction des tumeurs, mais la majorité des études rapportent la tendance à un meilleur pronostic dans les mélanomes surexprimant PD-L1^{142,154,158,160}. Ces études sont celles qui décrivent la présence conjointe d'un infiltrat T important^{142,154,158,160}. Massi et coll. ont au contraire décrit un moins bon pronostic dans les mélanomes surexprimant PD-L1, mais dans cette série, la surexpression de PD-L1 n'était pas forcément associée à un infiltrat lymphocytaire T¹⁵³.

Les premières études descriptives de l'expression de PD-L1 au cours de l'évolution naturelle du mélanome tendaient à montrer, avec une disparité entre les descriptions effectuées sur de faibles effectifs, une tendance à l'augmentation progressive de l'expression tumorale de PD-L1 et/ou lymphocytaire de PD-1, entre le primitif cutané et la métastase ganglionnaire loco-régionale, en passant par les métastases en transit^{160,161}. Des études ultérieures à plus large échelle, et décrivant l'évolution longitudinale de l'expression de PD-L1 pour chaque patient, ne retrouvent aucune tendance évolutive stéréotypée de l'expression de PD-L1 au cours de l'évolution naturelle, ou sous traitement, du mélanome, ne retenant que la grande variabilité inter- et intra-individuelle de l'expression de PD-L1^{156,158}.

I.A.2.2.4 Une multitude d'autres checkpoints immunologiques

L'exhaustion lymphocytaire traduit un état de différenciation lymphocytaire alternatif à la différenciation en lymphocytes mémoires, qui survient en situation d'inflammation chronique et d'exposition antigénique persistante²⁷. Dans cette situation, les lymphocytes s'« épuisent » progressivement, perdant leurs fonctions effectrices, sans pour autant acquérir les fonctions lymphocytaires mémoires²⁷.

Cet « épuisement » progressif n'est pas le fait d'un seul checkpoint immunologique inhibiteur, mais de la co-expression de multiples checkpoints (figure 7), associée à plusieurs autres phénomènes incluant reprogrammation transcriptionnelle, épigénétique, métabolique^{27,162}.

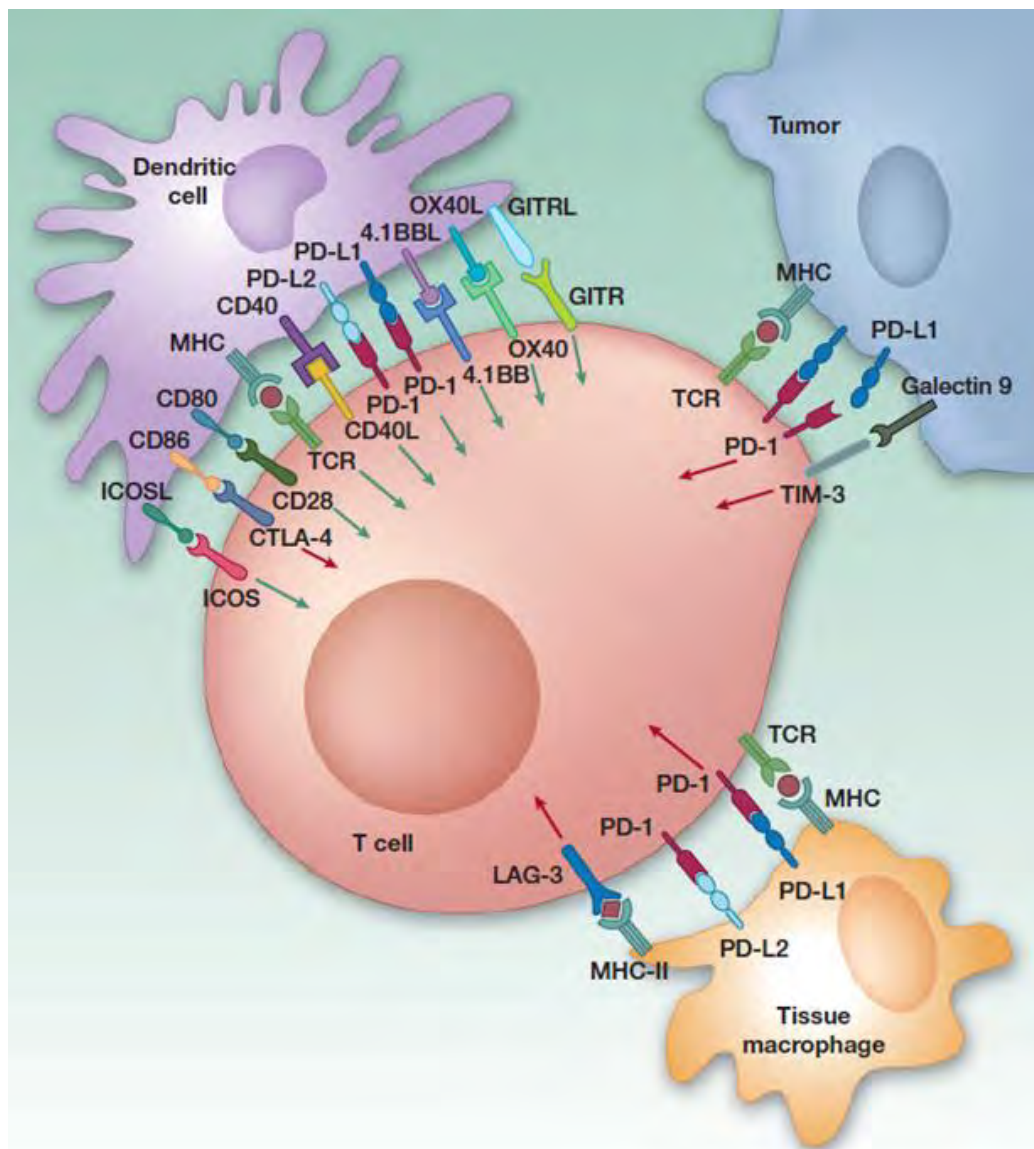


Figure 7. Les checkpoints immunologiques : molécules costimulatrices ou co-inhibitrices régulant les interactions entre les cellules T, les cellules présentatrices d'antigène et les macrophages. Ott et al CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in melanoma patients. Clin Cancer Res 2013.

De multiples checkpoints immunologiques (TIM3, LAG3, TIGIT, Ox40...) sont donc actuellement ciblés dans des stratégies d'immunothérapie en cours de développement plus ou moins avancé, notamment dans l'objectif de réaliser des combinaisons thérapeutiques synergiques avec les inhibiteurs de PD-1^{163,164}.

Il faut cependant garder en mémoire que l'expression des checkpoints immunologiques n'est pas seulement liée à une exhaustion pathologique des lymphocytes T, et qu'elle peut également refléter différents états physiologiques de différenciation et d'activation lymphocytaire, avec dans chaque situation, un profil de co-expression plus ou moins caractéristique, selon le type de checkpoints co-exprimés et de leurs niveaux d'expression respectifs¹⁶⁵(figure 8).

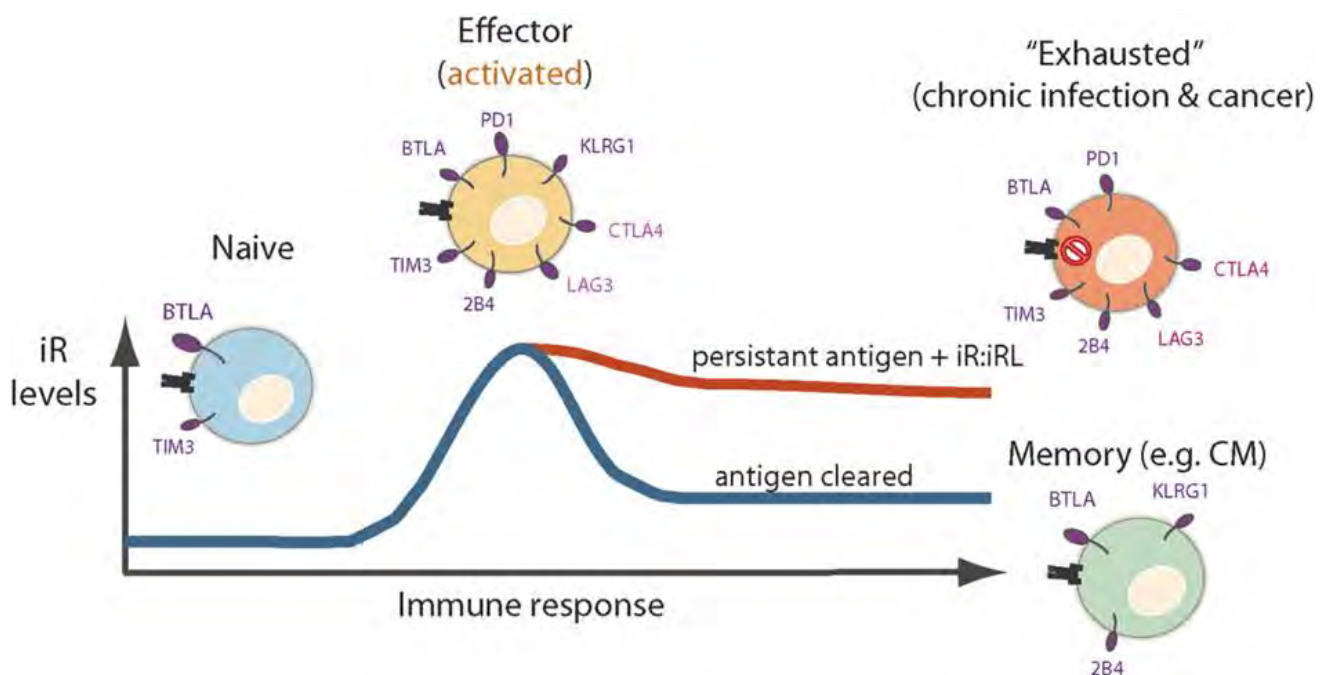


Figure 8. Le niveau d'expression des récepteurs inhibiteurs (« iR » pour « inhibitory Receptors » ou checkpoints inhibiteurs) atteint un pic lors de la phase effectrice de la réponse immunitaire, puis varie ensuite en fonction de la résolution ou la chronicité de la réponse immunitaire. D'après Fuertes Marraco et coll. Inhibitory receptors beyond T cell exhaustion. Frontiers in immunology 2015.

Une meilleure compréhension de la régulation physiologique de ces multiples checkpoints au cours de la réponse immunitaire normale, ainsi que de leur dérégulation pathologique dans les cancers, semble donc importante pour mieux prédire et contourner les phénomènes de résistances aux inhibiteurs de PD-1¹⁶⁶.

I.B L'immunothérapie du mélanome

L'immunothérapie des cancers, définie comme l'utilisation des réponses immunitaires de l'hôte pour lutter contre les tumeurs, a été introduite à la fin du XIX^{ème} siècle par William B. Coley¹⁶⁷, qui après avoir constaté plusieurs cas de régression tumorale spontanée chez des patients ayant développé un érysipèle, tenta d'injecter une culture bactérienne (*Streptococcus pyogenes* et *Serratia marcescens*) dans les tumeurs de plusieurs patients avec des résultats sporadiques très peu reproductibles.

I.B.1 Les inhibiteurs des checkpoints immunologiques

L'immunothérapie antitumorale est actuellement à l'origine d'une modification profonde des concepts thérapeutiques en oncologie suite à l'arrivée des inhibiteurs de checkpoints (« breakthrough of the year » 2013 du journal « Science »^{168,169}. Contrairement aux anciennes immunothérapies de type cytokiniques ou de type immunostimulants bactériens, qui visent à activer les réponses immunitaires endogènes de l'hôte, les nouvelles immunothérapies de type inhibiteurs de checkpoints ont pour objectif de lever les freins au système immunitaire mis en place par la tumeur en réponse à la pression de sélection immunitaire du micro-environnement. Le mélanome métastatique a permis de faire chez l'homme la preuve de concept thérapeutique des inhibiteurs de checkpoint^{170,171}. Le nombre de molécules et les indications des inhibiteurs de checkpoints sont en train de s'étendre à une vitesse exponentielle, y compris à des tumeurs réputées jusqu'à récemment non immunogènes (tels que les carcinomes bronchiques par exemple).

Le profil des effets indésirables et le rapport bénéfice / risque de ces molécules impose cependant une identification des sous-populations de patients susceptibles d'être répondeurs, au moyens de facteurs prédictifs de plus en plus complexes, dans un souci de précision et de médecine personnalisée.

D'abord sont apparus les inhibiteurs de CTLA4, première molécule à démontrer un bénéfice en survie globale^{172,173}, puis sont apparus les inhibiteurs de PD-1 / PDL-1, qui ont des taux de réponses supérieurs aux inhibiteurs de CTLA4, avec toujours un profil de réponses prolongées se traduisant par un gain en survie globale⁷⁴, opérant un réel changement de paradigme dans les traitements du mélanome. Leur indication est validée au stade métastatique ; des essais cliniques sont en cours aux stades précoces.

Des défis majeurs restent cependant à relever, les prochains étant la mise au point de biomarqueurs prédictifs de réponse, et le développement de combinaisons thérapeutiques ayant un rapport bénéfice/risque acceptable, le deuxième point dépendant en partie du premier. En effet l'essai clinique de phase III comparant l'association Nivolumab-Ipilimumab versus le Nivolumab seul, montre que la bithérapie permet d'augmenter le taux de réponses, y compris des mélanomes moins souvent répondeurs aux anti- PD-1 en monothérapie (avec une expression tumorale de PD-L1 < 5% des cellules tumorales), mais au prix d'une toxicité non négligeable (près de 60% d'effets secondaires de grade 3-4) (⁷³).

I.B.1.1 Inhibiteurs de CTLA4

L'Ipilimumab a été la première immunothérapie à démontrer une amélioration en termes de survie globale des patients atteints de mélanome avancé^{172,173}.

Il a été évalué dans une étude randomisée en double aveugle conduit par Hodi et al¹⁷² chez 676 patients porteurs d'un mélanome métastatique ou avancé non résécable et ayant déjà

reçu un traitement systémique. 3 groupes ont été comparés : Ipilimumab 3 mg/kg/jour plus placebo (IPI+PCB), Ipilimumab plus vaccin peptidique gp100 (IPI+gp100) ou gp100 plus placebo (IPI+PCB). La médiane de survie globale était significativement supérieure dans les groupes IPI+PCB et IPI+gp100 en comparaison avec le groupe gp100+PCB (11, 2 et 10.12 mois contre 6,4, $P < 0.001$). Les taux de survie globale à un an et à deux ans étaient respectivement de 45.6 % et 23,5 % pour IPI+PCB contre 25,3 et 13.7 % pour gp100+PCB et de 43,6 % et 21.6 % pour IPI+gp100.

Robert et al¹⁷³ ont publié un second essai clinique de phase III chez 502 patients non traités. La survie globale était significativement augmentée avec l'Ipilimumab (10 mg/kg/3 semaines, 4 injections) en association avec la dacarbazine en comparaison avec la dacarbazine plus placebo (11,2 mois contre 9,1 mois). La survie globale à 1, 2 et 3 ans était également significativement augmentée chez les patients ayant reçu le traitement par l'Ipilimumab et dacarbazine ; 47,3, 28,5 et 20,8 % respectivement contre 36,3, 17,9 et 12,2 % pour le groupe placebo et dacarbazine ($p < 0.001$).

Outre une efficacité préalablement jamais observée pour le traitement du mélanome avancé, ces 2 essais prouvaient en thérapeutique humaine la réalité du concept d'immunothérapie des cancers par inhibition des checkpoints immunologiques.

L'agence européenne du médicament (EMA) a accordé en 2011 une autorisation de mise sur le marché à l'Ipilimumab pour le traitement du mélanome métastatique (avancé) stade III non résectable ou stade IV à la dose de 3 mg/kg toutes les 3 semaines pour un total de 4 doses¹⁷⁴.

I.B.1.2 Inhibiteurs de PD-1

I.B.1.2.1 Indications et AMM en monothérapie

Le nivolumab^{175,176} et le pembrolizumab¹⁷⁷ sont deux anticorps monoclonaux IgG4 dirigés contre PD-1. Ils ont démontré leur supériorité par rapport à l'Ipilimumab en termes de taux de réponses, survie sans progression et survie globale dans 3 essais de phases III. Ils sont donc désormais privilégiés en première intention depuis leur obtention d'AMM en 2015 dans le traitement en première ligne des mélanomes non résectables ou métastatiques non mutés BRAF, et en 2^{ème} ligne et plus, après traitement préalable par inhibiteur de BRAF dans les mélanomes mutés BRAF V600.

Le Nivolumab a été comparé à la Dacarbazine dans une étude de phase III contrôlée randomisée conduite par C. Robert chez 418 patients porteurs de mélanomes avancés non mutés BRAF en première ligne¹⁷⁵. Il y avait 2 bras de randomisation : Nivolumab 2 mg/kg toutes les 2 semaines et Dacarbazine 1000 mg/m² toutes les 3 semaines. La médiane de survie sans progression était significativement supérieure dans le bras Nivolumab, à 5.1 mois contre 2.2 mois dans le bras Dacarbazine. Le taux de survie à 1 an était significativement supérieur dans le bras Nivolumab, à 72.9% contre 42.1% dans le bras Dacarbazine. Les taux de réponses étaient de 40% dans le bras Nivolumab versus 13.9% dans le bras Dacarbazine.

Le Nivolumab a été comparé à de la chimiothérapie selon le choix de l'investigateur (dacarbazine 1000 mg/m² toutes les 3 semaines ou carboplatine AUC6 + paclitaxel 175 mg/m² toutes les 3 semaines), dans une étude de phase III menée par J. Weber chez 405 patients porteurs de mélanomes métastatiques en seconde ligne thérapeutique après échec de l'Ipilimumab¹⁷⁶. 405 patients ont été randomisés dans 2 bras de traitement et ont été

stratifiés en fonction du statut mutationnel BRAF et de l'expression de PD-L1 avec un seuil de positivité à 5% des cellules tumorales. La médiane de survie sans progression dans les bras Nivolumab était de 4.7 mois contre 4.2 mois dans le bras chimiothérapie. Le taux de réponse de 31.7% dans le bras Nivolumab versus 10.6% dans le bras chimiothérapie. Il n'y avait pas de différence significative du taux de réponses entre les sous-groupes prédéfinis en fonction du statut mutationnel BRAF. Il y avait une différence significative entre les sous-groupes prédéfinis en fonction du statut PD-L1 : 22% de réponses dans le groupe PD-L1 positif versus 5% dans le sous-groupe PD-L1 négatif.

Le Pembrolizumab a été comparé à l'Ipilimumab dans une étude de phase III conduite par C. Robert chez 834 patients porteurs de mélanomes avancés en première ligne¹⁷⁷. Il y avait trois bras de randomisation : Pembrolizumab 10 mg/kg toutes les 2 semaines, Pembrolizumab 10 mg/kg toutes les 3 semaines, et Ipilimumab 3 mg/kg toutes les 3 semaines quatre fois. La médiane de survie sans progression dans les bras Pembrolizumab était respectivement de 5.5 et 4.1 mois contre 2.8 mois dans le bras Ipilimumab. Les taux de survie à 1 an étaient de 68.4% et 74.1% dans les bras Pembrolizumab contre 58.2% dans le bras Ipilimumab. Les taux de réponses étaient de 32.9% et 33.7% dans les bras Pembrolizumab contre 11.9% dans le bras Ipilimumab. Le bénéfice en termes de taux de réponses et de survie était retrouvé dans tous les sous-groupes définis selon le statut PD-L1 (avec un seuil de positivité fixé à 1% des cellules tumorales). Les résultats de l'analyse finale de l'étude Keynote 006 ont été présentés à l'ASCO 2016, après un suivi médian de 23 mois. L'efficacité sur la survie globale et la survie sans progression a été confirmée avec un recul de 2 ans, sans différence significative selon le dosage du Pembrolizumab et avec un net plateau sur les courbes de survie. Les taux de réponse complète restaient significativement supérieurs dans le bras Pembrolizumab comparativement au bras Ipilimumab (37% et 36% versus 13% pour Ipilimumab). Les effets indésirables les plus fréquents associés au Pembrolizumab étaient les dysthyroïdies ; la colite restant préférentiellement associée à l'Ipilimumab.

Eu égard à ces résultats, les anti-PD-1 constituent actuellement l'immunothérapie de première ligne des mélanomes non résecables ou métastatiques. Cependant, malgré des résultats encourageants, la majorité des patients reste non répondeuse, et nécessitera une ligne thérapeutique ultérieure. La question se pose dès lors de savoir quelle est la séquence de prescription optimale des différentes molécules de l'arsenal anti-mélanome. Les résultats de l'essai de phase II CheckMate 064 ont été publiés en juillet 2016¹⁷⁸. 120 patients étaient randomisés dans 2 bras de traitement : Nivolumab monothérapie toutes les 2 semaines pendant 12 semaines suivi d'Ipilimumab toutes les 3 semaines pour 4 injections ou l'inverse Ipilimumab suivi de Nivolumab. En termes de taux de réponse à la 25ème semaine, l'administration de Nivolumab puis Ipilimumab semble plus efficace avec 41 % de réponse contre 20 % en cas d'administration d'Ipilimumab suivi de Nivolumab. Ce résultat est cependant trop préliminaire pour permettre de déterminer une stratégie nette d'échelonnement des inhibiteurs de checkpoints, le délai de 25 semaines correspondant au délai médian de réponse à la seconde ligne engagée et ne permettant pas d'évaluer avec efficacité la survie globale des patients, qui reste le critère le plus objectif de mesure de l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux.

I.B.1.2.2 Indication et AMM en combinaison thérapeutique

L'association Nivolumab et Ipilimumab a été approuvée aux Etats-Unis en octobre 2015 et vient tout récemment (juin 2016) d'être autorisée en Europe.

L'association des anti-CTLA-4 et anti-PD-1 a fait l'objet de plusieurs études. L'essai CheckMate 067¹⁷⁹ a comparé 3 bras de traitement : Nivolumab + Ipilimumab ou Nivolumab versus Ipilimumab et a mis en évidence des médianes de survie respectives de 11,5 mois versus 6,9 et 2,9 mois. Les taux de réponse étaient de 57,6%, 43,7% et 19 % respectivement. Cette efficacité est cependant obtenue au prix d'une forte toxicité puisque la fréquence des effets indésirables de grade 3 ou 4 était de 55 % dans le bras combinaison contre 27 % pour l'Ipilimumab seul, ce dernier étant significativement plus toxique que le Nivolumab seul.

L'actualisation à l'ASCO 2016, a confirmé l'efficacité en terme de survie sans progression, avec, également dans cette étude, l'apparition d'un plateau¹⁸⁰. La différence est majeure entre Ipilimumab + Nivolumab et Ipilimumab seul. La différence semble moins marquée dans le bras Nivolumab en monothérapie. Le bénéfice en termes de survie sans progression en comparaison avec le Nivolumab en monothérapie (objectif exploratoire, le bras comparateur étant le bras Ipilimumab, l'étude n'est pas construite pour mettre en évidence des différences entre Nivolumab et Ipilimumab + Nivolumab) semble préférentiellement observé dans la population des patients n'exprimant pas PD-L1 (définie par un seuil de positivité à 5%).

A noter toutefois que la bithérapie semble quand même augmenter le taux de réponse globale, y compris chez les patients PD-L1 positifs (chez les patients PD-L1 positifs : taux de réponses de 20% dans le bras Ipilimumab, 57.5% dans le bras Pembrolizumab, et 72.1% dans le bras bithérapie ; chez les patients PD-L1 négatifs : taux de réponses de 20% dans le bras Ipilimumab, 41.3% dans le bras Pembrolizumab, et 54.8% dans le bras bithérapie). Il est donc important d'attendre les données de survie globale pour préciser le bénéfice éventuel de la bithérapie chez les patients PD-L1 positifs.

I.B.2 Biomarqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs du checkpoint PD-1

I.B.2.1 Enjeux

I.B.2.1.1 Sélection des patients susceptibles de répondre

La sélection initiale est d'autant plus importante que la première évaluation de la réponse est retardée (à trois mois) en raison du long délai d'action des immunothérapies en général et des anti-PD-1 en particulier, et que la première évaluation tumorale peut-être trompeuse en raison des pseudo-progressions initialement observables¹⁸¹.

I.B.2.1.2 Escalade thérapeutique et aide au « design » des combinaisons d'immunothérapies chez les patients peu susceptibles de répondre

Chez les patients peu susceptibles de répondre à une mono-immunothérapie et sans alternative thérapeutique à l'immunothérapie, une prise de risque raisonnée d'exposition plus importante à des effets indésirables sévères liés à l'hyperactivation immune est licite, au moyen d'immunothérapies combinées (entre elles et/ou association avec d'autres modalités thérapeutiques anti-tumorales) en raison de la prédiction de non réponse à une immunothérapie simple.

I.B.2.1.3 Enjeux socioéconomiques

Les couts actuels des immunothérapies posent de façon caricaturale les problèmes d'économie de la santé et d'accès aux soins.

I.B.2.2 Les biomarqueurs clinico-biologiques historiques de réponse aux immunothérapies

Ils s'agit des marqueurs clinico-biologiques simples, essentiellement mis en évidence avec l'expérience clinique acquise lors des traitements par IL-2, qui semblent globalement s'appliquer aux inhibiteurs de PD-1 en monothérapie : faible masse tumorale, faible cinétique d'évolutivité tumorale, absence ou faible nombre de métastases viscérales, absence de localisation cérébrale, apparition d'un vitiligo sous immunothérapie¹⁸², faible taux de LDH (reflétant masse tumorale et métabolisme tumoral anaérobie).

I.B.2.3 Les deux principaux biomarqueurs histologiques prédictifs de la réponse aux anti-PD-1

L'expression tumorale de PD-L1 associée à un infiltrat lymphocytaire T CD8 positif au niveau du front d'invasion tumoral constitue à l'heure actuelle le seul marqueur prédictif potentiel de réponse aux anti-PD-(L)1, mais avec une valeur prédictive de la réponse trop insuffisante pour autoriser son utilisation en pratique courante¹⁸³.

I.B.2.3.1 L'expression de PD-L1

L'expression tumorale de PD-L1 semble être à ce jour, quel que soit le type tumoral, et pour le mélanome en particulier le meilleur facteur prédictif utilisable en routine pour prédire la réponse aux anti-PD-1. Il est en particulier supérieur à l'expression lymphocytaire de PD-1¹⁸³ et à l'expression tumorale de PD-L2 ne semble pas apporter d'information complémentaire, étant beaucoup moins fréquemment exprimé que PD-L1, et étant le cas échéant co-exprimé avec le PD-L1¹⁸³.

Dans les premiers essais de phase I évaluant le Nivolumab^{170,171}, les patients répondeurs avaient tous une expression membranaire de PD-L1 par les cellules tumorales, et tous les patients PD-L1 négatifs au niveau des cellules tumorales étaient non répondeurs, suggérant que l'on pourrait utiliser l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales comme marqueur prédictif de réponse, en s'appuyant en particulier sur sa valeur prédictive négative qui semblait maximale.

Les études qui suivirent révélèrent en réalité une proportion non négligeable de patients répondeurs parmi les cas PD-L1 négatifs, de l'ordre de 20% dans les mélanomes^{183,184} (figure 9).

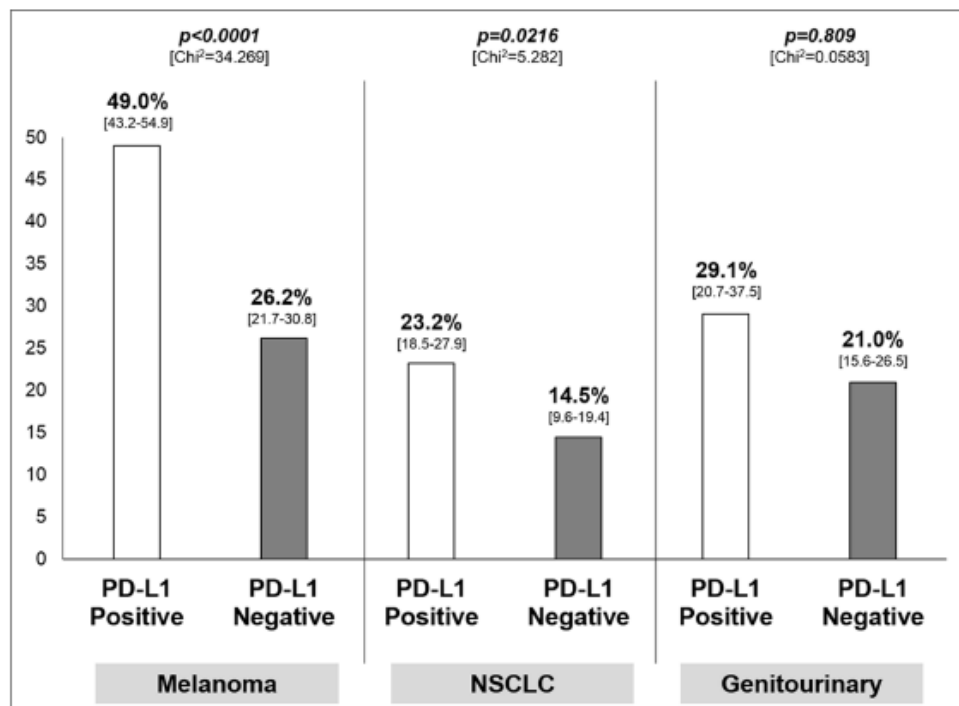


Figure 9. Activité différentielle du Nivolumab, du Pembrolizumab et du MPDL3280A selon l'expression ou non de PD-L1 par les cellules tumorales. Pourcentage de patients répondeurs selon le statut PD-L1 tumoral, le seuil de positivité étant défini par la présence de 5% de cellules tumorales positives. D'après Carbognin et coll. PLoS 2015.

L'expression tumorale de PD-L1 reste donc un facteur prédictif très imparfait, pour lequel de nombreuses tentatives d'optimisation et d'harmonisation des marquages sont en cours, afin de pouvoir bâtir des recommandations thérapeutiques reposant sur celui-ci. Il n'y a notamment pas de consensus concernant le seuil de positivité défini par le pourcentage de cellules tumorales PD-1 positives¹⁸³. Dans le mélanome, les essais cliniques évaluant le Nivolumab ont été bâtis sur un seuil de positivité à 5% des cellules tumorales marquées^{175,176}, alors ce seuil était fixé à 1% de cellules tumorales marquées dans les cliniques évaluant le Pembrolizumab¹⁷⁷, l'expression de ce marqueur étant évaluée dans les essais pivots par des anticorps différents n'ayant pas la même affinité pour la cible PD-L1 et ne marquant pas de manière similaire les cellules tumorales et les cellules du micro-environnement¹⁸⁵.

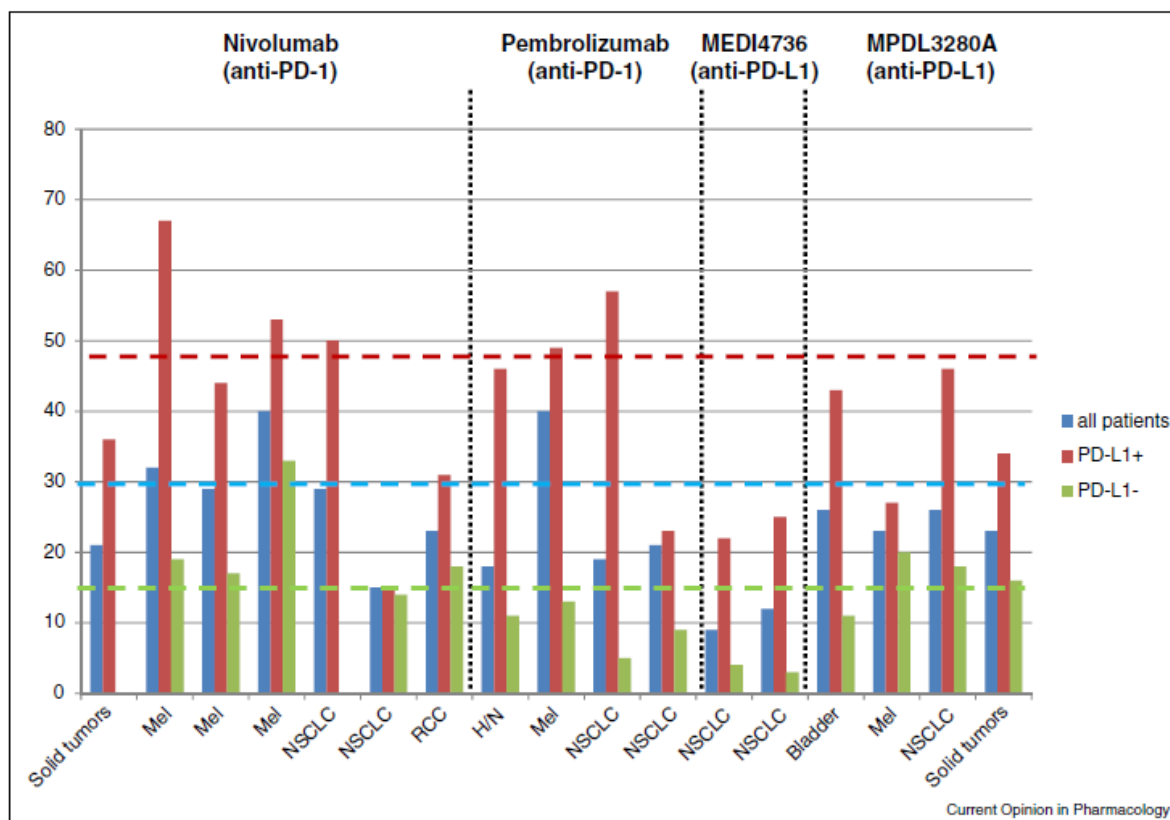


Figure 10. Pourcentage de répondeurs selon l'expression ou non de PD-L1 par les cellules tumorales, évaluée par différents anticorps pour l'immunomarquages PD-L1, développés chacun pour une molécule anti-PD-1 ou anti-PD-L1. D'après Sunshine et coll. PD-1 PD-L1 inhibitors. Curr Opin Pharmacol 2015.¹⁸⁴

De plus, jusqu'à récemment, la plupart des travaux ont étudié la valeur prédictive du PD-L1 exprimé par les cellules tumorales, mais tiennent rarement compte du PD-L1 micro-environnemental¹⁸⁶.

Les données concernant l'expression de PD-L1 par les cellules du micro-environnement sont essentiellement issues des études évaluant un anticorps anti PD-L1, l'Atezolizumab, dont les études de phase 1¹⁸⁷ en particulier dans les cancers de vessie¹⁸⁸, ont montré la corrélation avec un taux de réponses aux anti-PD-L1 plus élevé qu'avec le marqueur PD-L1 tumoral. Cependant dans une étude évaluant les facteurs prédictifs de réponse à l'anticorps anti PD-1 Nivolumab, Taube et coll. ont rapporté, sur 41 patients atteints de tumeurs solides, une valeur prédictive supérieure du marqueur PD-L1 tumoral comparé au marqueur PD-L1 micro-environnemental, seul le marqueur PD-L1 tumoral étant significativement associé à une réponse¹⁵⁶.

Enfin, il existe de nombreuses problématiques liées à l'hétérogénéité tumorale et à la variation temporelle de l'expression du PD-L1, posant la question de la représentativité de l'échantillon analysé, du nombre d'échantillons à analyser, de l'interprétation à pondérer en fonction du stade évolutif et du site tumoral et/ou métastatique (¹⁸⁹).

Par ailleurs, en plus des questions inhérentes à la biologie du mélanome et des checkpoints immunologiques, plusieurs problématiques techniques se posent, notamment l'absence d'harmonisation des techniques d'immunomarquages réalisées dans les différents centres, limitant la constitution de grandes cohortes d'analyse. Il y a notamment une multitude d'anticorps utilisés pour l'immunomarquage PD-L1, avec des performances différentes en

terme de sensibilité et de spécificité, variant en fonction du contexte tumoral et micro-environnemental¹⁸⁵. Des données récentes semblent cependant suggérer que les marquages réalisés avec les anticorps reconnaissant les épitopes situés au niveau du domaine intracytoplasmique de PD-L1 seraient plus performant pour délimiter les cellules tumorales PD-L1 positives¹⁸⁵.

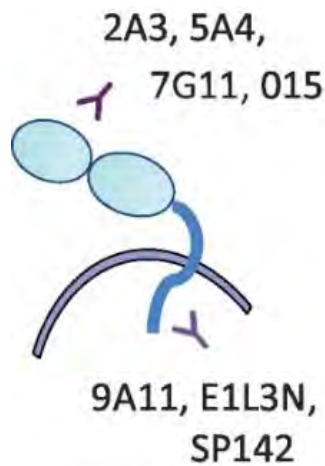


Figure 11. Épitopes intra- ou extra-cytoplasmiques reconnus par les différents anticorps développés pour l'immunomarquage PD-L1. Kathleen M. Mahoney et al. Cancer Immunol Res 2015;3:1308-1315.

I.B.2.3.2 L'infiltrat lymphocytaire T CD8

La présence ou non d'un infiltrat T CD8 positif intratumoral ou au front d'invasion, associé à l'expression ou non de PD-L1 au niveau de la tumeur a permis de définir quatre immunophénotypes tumoraux, qui permettent à l'heure actuelle le mieux de prédire la réponse aux anti-PD-1¹⁹⁰.

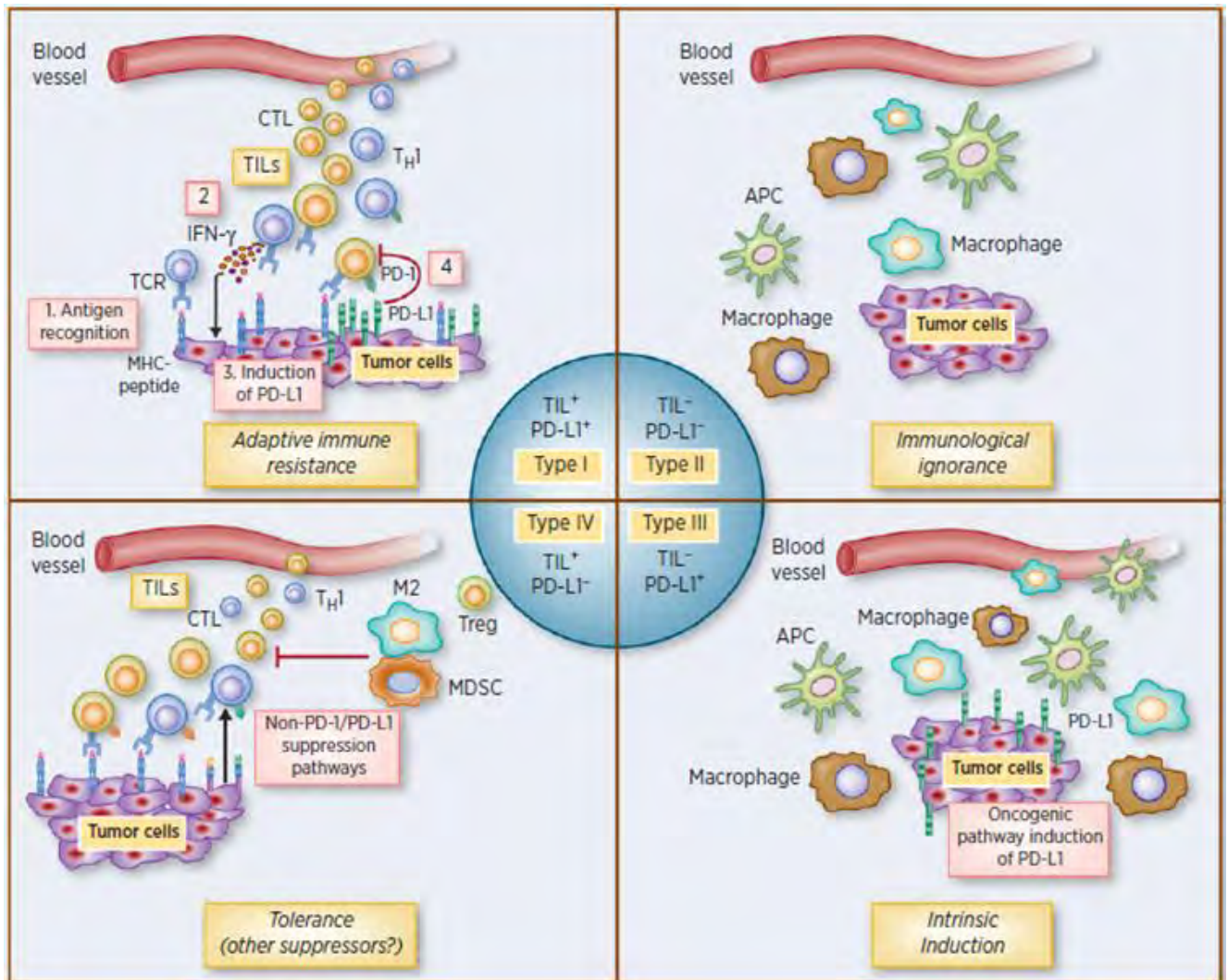


Figure 12. Teng et coll. Classifying cancers based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res-2015.

Les quatre immunophénotypes sont les suivants¹⁹⁰ :

- **La résistance immune adaptative** : présence d'un infiltrat T CD8⁺ et d'une expression de PD-L1, traduisant un épuisement (« exhaustion ») PD-L1 médié des cellules T CD8 suite à une réponse immunitaire effective : il s'agit du profil le plus susceptible de répondre aux anti-PD-1. Cette situation représente 38% des mélanomes¹⁹⁰.
- **La résistance immune innée** ou induction intrinsèque de PD-L1 : expression de PD-L1 en l'absence d'infiltrat T CD8, le plus souvent dans le cadre d'une voie d'activation oncogénique, en l'absence de réponse immunitaire préexistante. Cette situation ne concerne que 1% des mélanomes¹⁹⁰.
- **La tolérance immune**, liée à d'autres mécanismes immunosuppresseurs que le checkpoint PD-1/PD-L1 : présence d'un infiltrat T CD8 manifestement insuffisamment efficace en raison du développement tumoral, l'absence d'expression de PD-L1 incite à rechercher et cibler d'autres mécanismes immunosuppresseurs, dans 20% des mélanomes¹⁹⁰.
- **L'ignorance immune**, caractérisée par l'absence d'expression de PD-L1 et l'absence d'infiltrat T CD8 : l'enjeu dans ces tumeurs est d'induire un priming lymphocytaire et

l'expression de PD-L1 (par exemple avec un anticorps anti CTLA-4) pour ensuite les traiter par anti-PD-1. Cette situation concerne environ 41% des mélanomes¹⁹⁰.

Tumeh et coll. ont de plus montré la valeur prédictive accrue de facteurs prédictifs complexes associant ces deux paramètres principaux à savoir l'expression de PD-L1 et l'infiltrat T CD8¹⁵⁷. Il s'agit de paramètres évaluant la proximité entre lymphocytes PD-1 positifs et les cellules (tumorales ou du micro-environnement) PD-L1 positives, l'activation cellulaire T CD8 (estimée par le co-marquage CD8 et Ki-67 la recherche de clonalité des cellules T par séquençage du TCR) et les marqueurs de la voie de signalisation de l'interféron gamma¹⁵⁷.

Les auteurs ont ainsi retrouvé, chez les patients répondeurs : une expression significativement plus importante de PD-L1, et un infiltrat CD8 plus important et/ou avec un répertoire plus clonal. L'expression de PD-L1 concernait aussi bien le front d'invasion tumoral que le centre de la tumeur, et la nature des cellules PD-L1 positives, tumorales ou du microenvironnement n'était pas prise en compte. L'infiltrat CD8 prédominait au front d'invasion tumoral chez les patients répondeurs. Les auteurs ont de plus observé chez les patients répondeurs, une expansion des lymphocytes T CD8 totaux sous traitement, intéressant en particulier le contingent de lymphocytes T mémoires¹⁹¹.

I.B.2.4 Des biomarqueurs génomiques

I.B.2.4.1 Tumoraux : la charge mutationnelle

Les cancers les plus immunogènes, du moins les plus sensibles aux nouvelles immunothérapies par inhibiteurs de checkpoints, s'avèrent également être ceux qui ont la charge mutationnelle la plus élevée (figure 13), supposée être génératrice d'une charge néoantigénique importante reconnue par les défenses immunitaires de l'hôte¹⁹². L'immunogénicité supérieure des tumeurs ayant les fortes charges mutationnelles a notamment été montrée au sein des mélanomes¹⁹³.

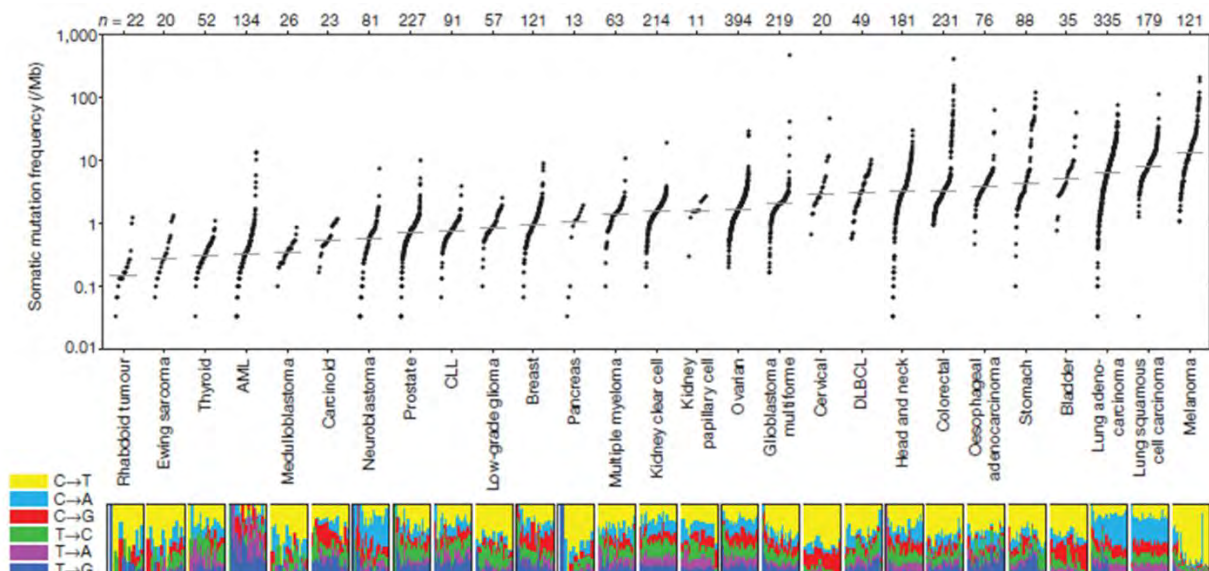


Figure 13. Charge mutationnelle selon l'histologie tumorale. Lawrence et coll. Nature 2013¹⁹²

I.B.2.4.2 Immunitaires : « immune gene signature »

Après l'explosion de l'utilisation des techniques de séquençage à haut débit visant à préciser les caractéristiques de chaque tumeur développée chez un individu donné, sur le plan oncogénique puis sur le plan néoantigénique (les mutations oncogéniques et immunogéniques n'étant pas toujours superposables), afin de bâtir un traitement personnalisé du cancer, la tendance actuelle est de caractériser la signature d'expression génique du système immunitaire de l'hôte qui va être la cible d'une immunothérapie personnalisée. Ainsi, les profils d'expression génique de type « interféron gamma » seraient par exemple associés à la réponse au Pembrolizumab¹⁹⁴.

I.B.2.5 Biomarqueur prédictif de réponse ou monitoring précoce de la réponse ?

A défaut de pouvoir prédire avec acuité la réponse aux anti-PD-1, une stratégie alternative actuellement envisagée est celle du monitoring dynamique de la réponse, notamment avec le suivi de l'ADN tumoral circulant. Cela permettrait de détecter rapidement les patients non répondeurs, avant que les critères cliniques et iconographiques ne parlent, afin de permettre une adaptation thérapeutique précoce¹⁹⁵.

I.B.3 Problématique et question posée

Le taux de réponse des mélanomes métastatiques aux anti-PD-1 en monothérapie est d'environ 40%, chiffre qui rend compte d'une majorité de patients qui ne vont pas répondre aux anti-PD-1 en monothérapie.

L'escalade thérapeutique au moyen d'une bithérapie associant anti-PD-1 et anti-CTLA4 permet une augmentation du taux de réponses, avec près de 60% des patients présentant une réponse à la première évaluation thérapeutique. Cette amélioration du taux de réponse s'accompagne également d'une augmentation du risque d'effets secondaires sévères d'ordre immunologiques, avec près de 50% des patients traités subissant un effet indésirable sévère grade 3/4 CTCAE.

Par ailleurs ces traitements, possiblement inefficaces en monothérapie, et possiblement toxiques en bithérapie, posent également le problème de leur coût exorbitant.

La problématique est celle d'un facteur prédictif de réponse aux anti-PD-1 qui permettrait d'aider à la décision thérapeutique pour initier une immunothérapie par anti-PD-1, et le cas échéant de guider le choix thérapeutique entre mono- ou bithérapie.

L'expression tumorale de PD-L1 est à ce jour le seul facteur prédictif de réponse utilisable en routine, mais ses performances prédictives insuffisantes et le manque de standardisation des techniques de marquage et méthodes de lecture, limitent sa signification.

Nous avons émis l'hypothèse que nous pourrions améliorer les performances prédictives du marqueur PD-L1 tumoral, en caractérisant de façon simple, le profil d'expression multi-composante de PD-L1.

II. MATERIEL ET METHODES

II.A Patients

Les patients ont été identifiés depuis la base de données des patients ayant reçu un inhibiteur PD-1, Nivolumab ou Pembrolizumab, dans le cadre de l'ATU de cohorte à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, et le registre des prélèvements histopathologiques.

Nous avons sélectionné les patients de façon à établir 2 groupes selon l'efficacité thérapeutique observée des inhibiteurs de PD-1 : « répondeurs » et « non répondeurs », et selon le matériel tumoral archivé (patients pour lesquels le matériel tumoral était suffisant pour conduire une évaluation en immunohistochimie sans compromettre l'archivage sanitaire).

II.B Échantillons

L'analyse n'a été effectuée que sur des échantillons tissulaires (cytologies exclues), issus de pièces opératoires d'exérèse de mélanomes primitifs et de métastases (cutanées et ganglionnaires), permettant une analyse de la tumeur et de son micro-environnement en particulier au front d'invasion tumoral ou équivalent métastatique. Ceci nous a amené à exclure les prélèvements biopsiques et à ne pas réaliser de Tissue MicroArray sur les prélèvements choisis (par définition partiels).

Il s'agissait d'échantillons de type FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded). L'ancienneté des échantillons datait de 2003 à 2015.

Les patients préférentiellement choisis étaient ceux pour lesquels nous disposions de multiples échantillons analysables, afin de rechercher un éventuel profil évolutif spatial et/ou temporel caractéristique d'un profil de réponse. Pour la majorité des patients, les immunomarquages ont donc été réalisés sur l'ensemble des échantillons disponibles pour un patient donné.

Pour l'analyse finale, le résultat était celui observé sur le dernier prélèvement effectué avant initiation du traitement anti-PD-1 (prélèvement jugé le plus représentatif de la maladie métastatique active car le plus récent dans l'histoire naturelle de chaque cas). En cas de blocs multiples réalisés au sein du même prélèvement, c'est le bloc le plus positif pour PD-L1 qui a été choisi pour l'analyse finale.

II.C Réactifs et immunomarquages

Les anticorps suivants ont été utilisés : PD-L1 (SP142 Spring REF 07309457001) ; CD3 (Dako REF A045201) ; CD8 (SP57 Ventana REF 05937248001) ; CD163 (MRQ26 Cell Marque REF 05973929001) ; Sox10 (SC365692 Santa Cruz) ; CD56 (MRQ42 Cell Marque REF 06433359001).

Tous les simples marquages ont été réalisés après déparaffinage, chauffage à 72° et révélation en peroxydase.

L'immunomarquage PD-L1 a été réalisé avec l'anticorps SP142, qui présente la particularité d'être dirigé contre le domaine intra-cytoplasmique de PD-L1, les épitopes cytoplasmiques de PD-L1 ayant récemment été décrits comme plus représentatifs du statut PD-L1 en immunomarquage¹⁸⁵.

La distinction des macrophages PD-L1 positifs et cellules tumorales PD-L1 positives s'est révélée être parfois difficile en simple marquage PD-L1 : le recours à un double marquage Sox10/PD-L1 a permis de distinguer les macrophages PD-L1 positifs, ayant parfois un aspect « tumoral » trompeur (grandes cellules pléomorphes et/ou atypiques) des cellules tumorales de mélanomes ayant un marquage Sox10 nucléaire caractéristique (Sox10 est un facteur de transcription spécifique des cellules de mélanomes).

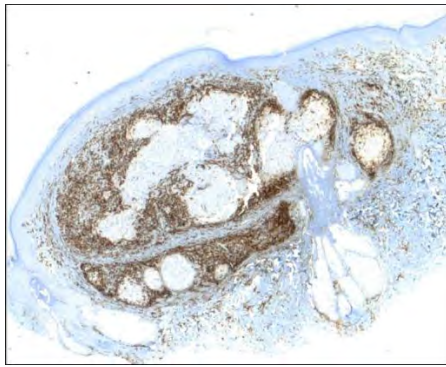
Les différentes composantes cellulaires, PD-L1 positives ou non, ont été quantifiées en pourcentage de surface tumorale totale occupée, ce qui a rendu la comparaison possible entre différentes entités hétérogènes sinon difficilement comparables.

L'infiltrat lymphocytaire CD8 positif a été quantifié en pourcentage de cellules CD8 positives au sein de la population totale T CD3, estimée par lectures successives de coupes sériées.

Les cellules tumorales PD-L1 positives ont de plus été quantifiées de façon « usuelle » en pourcentage de cellules tumorales PD-L1 positives sur le pourcentage de cellules tumorales totales.

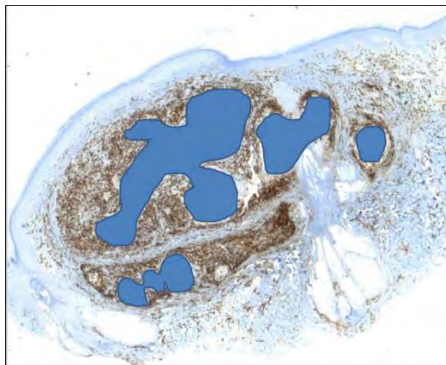
Nous avons pris en compte dans la définition de la surface tumorale totale (hors organe lymphoïde) : la tumeur proprement dite et l'infiltrat immunitaire (figure 14).

Figure 14. Métastase cutanée de mélanome (immunomarquage CD163).

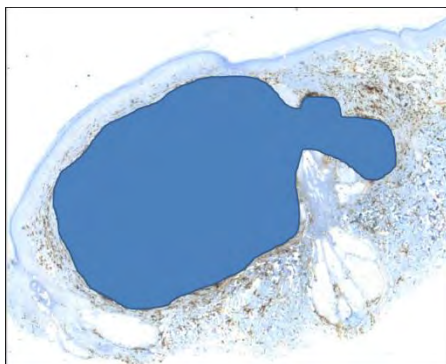


modalité de mesure de la surface tumorale : surface tumorale totale

a- immunomarquage CD 163



b- exemple de restriction de la mesure de la surface tumorale aux foyers de cellules tumorales

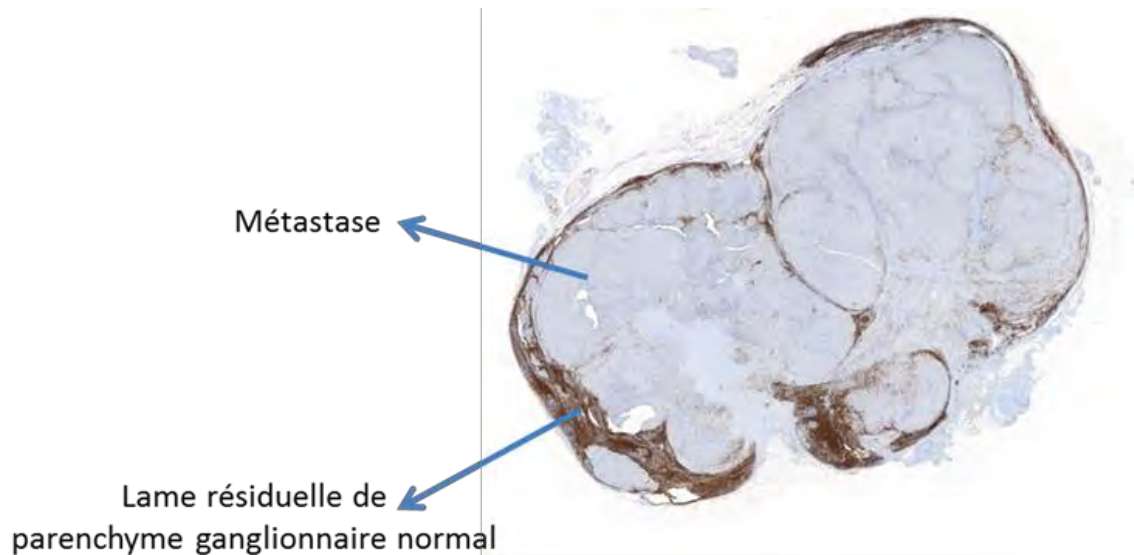


c- exemple de mesure de la surface tumorale globale intégrant l'infiltrat réactionnel. Méthode retenue pour ce travail.

Nous avons décrit la distribution des cellules tumorales marquées par PD-L1 et des cellules du micro-environnement (TIL) CD3 et CD8 positives : que nous avons qualifiée de distribution intratumorale ou péri tumorale. Nous avons utilisé le terme « péri tumoral » (équivalent du front d'invasion tumoral décrivant les lésions primitives) pour homogénéiser la description des lésions primitives et métastatiques. Les TIL péri tumoraux concernaient, quoi qu'il en soit, toujours des lymphocytes situés au contact des cellules tumorales.

Dans le cas particulier des métastases ganglionnaires : la quantification des TIL a été restreinte aux TIL intratumoraux, les TIL péri tumoraux étant non analysables pour des raisons propres au site ganglionnaire.

Figure 15. Immunomarquage CD3 d'un ganglion métastatique illustrant le caractère inapproprié du terme « lymphocytes péri-tumoraux » dans cette situation.



Devant la rareté des cellules Natural Killer CD56 positives dans les infiltrats, leur présence a été évaluée de façon binaire (présence/absence). Les cellules pléomorphes correspondant aux cellules de mélanomes connues pour pouvoir exprimer le marqueur neuroendocrine CD56 n'ont pas été comptabilisées. Nous ne sommes pas allés plus avant dans l'exploration des cellules Natural Killer, devant leur rareté et /ou absence constantes, non discriminantes entre répondeurs et non répondeurs aux anti-PD-1.

Un simple marquage CD163 a été réalisé de façon ponctuelle : pour aider à l'estimation de la quantité de macrophages de phénotype M2, par ailleurs réalisée sur les triples marquages Sox10-CD8-CD163

Un double marquage Sox10/PD-L1 a été réalisé pour les cas où la distinction entre cellules tumorales PD-L1 positives et macrophages PD-L1 positifs était difficile (Sox10 révélé en rouge (phosphatase alcaline) et PD-L1 révélé en marron (peroxydase)).

Un triple marquage Sox10/CD8/CD163 a été réalisé sur tous les échantillons pour étudier la répartition respective de ces différentes populations cellulaires et faciliter l'identification des cellules PD-L1 positives (marquage Sox10 nucléaire révélé en violet (peroxydase), marquage CD8 membranaire révélé en marron (peroxydase), et marquage CD163 membranaire révélé en rouge phosphatase alcaline).

II.D Lecture des immunomarquages

Pour éviter les biais d'interprétation, la lecture des immunomarquages a été réalisée : à l'aveugle (sans connaissance du statut répondeur ou non répondeur aux anti-PD-1 de la tumeur analysée), et dans un ordre aléatoire indépendant du patient et du bloc dont ils étaient originaires (quand il y avait plusieurs prélèvements pour un même patient, ou plusieurs blocs par examen).

II.E Interprétation des immunomarquages

Les cellules tumorales PD-L1 positives ont été quantifiées en pourcentage de cellules tumorales positives ; le seuil de positivité retenu était de 5% des cellules tumorales marquées.

Les cellules tumorales PD-L1 positives ont de plus été quantifiées en pourcentage de surface tumorale totale, tout comme les cellules du micro-environnement PD-L1 positives ; le seuil de positivité retenu était de 1% de la surface tumorale totale marquée.

Le seuil de 1% de surface tumorale marquée a été choisi car correspondant à la surface tumorale minimale correspondant à 5% de cellules tumorales PD-L1 positives. Ce seuil de 1% de surface tumorale marquée a également été appliqué aux cellules du micro-environnement, par analogie avec les cellules tumorales, pour permettre la comparabilité.

Un score histologique a été utilisé lors de la lecture de l'immunomarquage PD-L1 : H-Score¹⁹⁶, pour prendre en compte l'hétérogénéité tumorale et micro-environnementale concernant l'expression de PD-L1, (contingents négatifs, positifs et parmi les contingents positifs, intensité hétérogène d'expression de PD-L1).

Nous avons proposé un algorithme de lecture des immunomarquages PD-L1, prenant en compte respectivement : l'« expression tumorale » (i.e. l'expression par les cellules tumorales) de PD-L1, l'« expression micro-environnementale » de PD-L1 (i.e. l'expression par les cellules du micro-environnement) et le statut mutationnel NRAS, dans le but d'améliorer les performances prédictives du marqueur PD-L1 tumoral pris isolément.

Nous avons rétrospectivement appliqué l'algorithme de prédiction proposé aux 21 patients de notre série.

Nous avons ensuite quantifié le taux de prédictions correctes, que nous avons nommées « concordances » (pour « concordance entre réponse prédite et réponse observée »), et le taux de prédictions incorrectes, que nous avons nommées « discordances » (pour « discordance entre réponse prédite et réponse observée »).

Nous avons ensuite comparé le taux de discordances obtenu avec le facteur prédictif « PD-L1 tumoral » simple et celui obtenu avec l'algorithme de prédiction proposé.

III. RESULTATS

III.A Caractéristiques de la population étudiée

III.A.1 Caractéristiques démographiques

Vingt-trois patients ont été analysés (sex ratio H/F de 1.5). L'âge médian au diagnostic était de 61 ans (de 27 à 81 ans).

III.A.2 Caractéristiques tumorales au diagnostic

Les mélanomes primitifs étaient principalement situés sur les membres inférieurs ou le tronc. Deux patients (8.7%) présentaient un mélanome métastatique de primitif inconnu. Le Breslow médian était de 2.8 mm (0,2 à 8 mm), et 38.9% des mélanomes primitifs étaient ulcérés. Quarante-cinq pourcents des patients avaient été diagnostiqués à un stade localisé (IA-IIIC), 40% à un stade régional (IIIA-IIIC) et 15% présentaient une maladie d'emblée métastatique systémique (IV).

Tableau 1. Caractéristiques tumorales au diagnostic de mélanome.

Site du primitif (n = 23)	N (%)
Membre inférieur	8 (34.8%)
Membre supérieur	2 (8.7%)
Tronc	7 (30.4%)
Tête et cou	3 (13.0%)
Muqueuse	1 (4.3%)
Sans primitif connu	2 (8.7%)
Breslow (mm) (n = 20)	
Médian (min-max)	2.8 (0.2 – 8)
Clark (n = 18)	N (%)
II	2 (11.1%)
III	5 (27.8%)
IV	8 (44.4%)
V	3 (16.7%)
Ulcération (n = 18)	N (%)
Non	11 (61.1%)
Oui	7 (38.9%)
Stade AJCC au diagnostic (n = 20)	N (%)
IA – IB	2 (10.0%)
IIA	5 (25.0%)
IIB – IIC	2 (10.0%)
IIIA	2 (10.0%)
IIIB	4 (20.0%)
IIIC	2 (10.0%)
IV	3 (15.0%)

III.A.3 Caractéristiques tumorales au stade métastatique

Tableau 2. Caractéristiques tumorales au stade métastatique.

Métastases synchrones* / métachrones (n = 23)	N (%)
Synchrones	3 (15%)
Métachrones	18 (78.3%)
Si métachrones, délai diagnostic – métastases	
Médian (min-max)	22.3 (1.1 -53.9)
Sites métastatiques	N (%)
Peau (n = 23)	13 (56.5%)
Ganglions (n = 22)	20 (90.9%)
Poumons (n = 23)	10 (43.5%)
Os (n = 22)	7 (31.8%)
Encéphale (n = 22)	9 (40.9%)
Foie (n = 22)	7 (31.8%)
Autre (n = 22)	13 (59.1%)

*Les métastases synchrones sont définies par la présence de métastases viscérales au diagnostic de mélanome.

III.A.4 Statut mutationnel au diagnostic

26.1% des tumeurs portaient une mutation BRAFV600 et 30.4% des tumeurs portaient une mutation NRAS (tableau 3).

Tableau 3. Statut mutationnel

Statut mutationnel	N (%)
Mutation BRAF (n = 23)	6 (26.1%)
Mutation NRAS (n = 23)	7 (30.4%)
Absence de mutation BRAF ou NRAS (n = 23)	11 (47.8%)

III.A.5 Caractéristiques des échantillons analysés en immunohistochimie

Soixante et un patients ont été identifiés depuis la base de données des patients ayant reçu un inhibiteur PD-1 et le registre des prélèvements histopathologiques ; nous avons sélectionné parmi ces patients, une sous-population de 23 patients de façon à réaliser notre étude pilote. Les patients ont été sélectionnés de façon à avoir autant de répondeurs (11 patients) que de non répondeurs (11 patients) et à enrichir la population en mélanomes PD-L1 positifs de façon à pouvoir réaliser l'étude de caractérisation du marquage PD-L1 (1 des 10 patients positifs a été retenu malgré l'absence de réponse évaluable, pour la mise au point de l'immunomarquage anti-PD-L1). Au total, 74 échantillons ont été analysés, représentant ces 23 patients. Deux patients ont ensuite été exclus de l'analyse : un pour réponse au traitement anti-PD-1 non évaluable (arrêt du traitement pour toxicité avant évaluation) et un autre patient pour épuisement du bloc d'intérêt (bloc de métastase pulmonaire épuisé, le seul échantillon analysable était un primitif non infiltrant probablement sans rapport avec la maladie métastatique). Un seul échantillon par patient a

été retenu pour l'analyse des facteurs prédictifs. Au final, 21 échantillons représentant 21 patients ont été retenus pour l'analyse des facteurs prédictifs (détails des caractéristiques de prélèvements dans les tableaux 4 et 5). Parmi eux, 10 étaient considérés répondeurs (comprenant 3 réponses complètes, 4 réponses partielles, 3 réponses partielles ou stabilisations suivies d'une réponse dissociée), et 11 non répondeurs.

Tableau 4. Caractéristiques des échantillons totaux analysés.

Echantillons totaux analysés (n = 74 échantillons) (n = 23 patients)	N (%)
Localisations	
Primitif cutané	5 (6.8%)
Métastase cutanée	38 (51.4%)
Métastase ganglionnaire	29 (39.2%)
Autres (1 métastase mammaire et 1 métastase pleurale)	2 (2.7%)
Echantillons multiples par patient	17 (73.9%)
Nombre médian (min-max) d'échantillons par patient	4 (2 – 7)
Délai médian (min-max) entre l'échantillon le plus ancien et l'échantillon le plus récent (mois)	5.5 (0 – 88)

Tableau 5. Caractéristiques des échantillons analysés pour les facteurs prédictifs.

Echantillons analysés pour les facteurs prédictifs (n = 21)	N (%)
Localisations	
Primitif cutané	1 (4.8%)
Métastase cutanée	11 (52.4%)
Métastase ganglionnaire	8 (38.1%)
Autre	1 (4.8%)
Autre traitement réalisé entre prélèvement et anti-PD-1	
Non	9 (42.9%)
Oui	12 (57.1%)
Si oui, Ipilimumab réalisé entre prélèvement et anti-PD-1	10 (47.6%)
Si oui, anti-BRAF réalisé entre prélèvement et anti-PD-1	4 (19.0%)
Si oui, chimiothérapie réalisée entre prélèvement et anti-PD-1	2 (9.5%)
Si oui, interféron réalisé entre prélèvement et anti-PD-1	1 (4.8%)

III.B Valeur prédictive de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales observée dans notre série

III.B.1 Quantitative (seuil de positivité à 5% des cellules tumorales)

Parmi les 11 cas non répondeurs : 7 cas étaient négatifs pour l'expression par les cellules tumorales de PD-L1 – nommé ensuite « PD-L1 tumoral » dans le reste de l'exposé - (soit 7 cas concordants sur 11) et 4 cas étaient positifs (soit 4 cas discordants sur 11).

Parmi les 10 cas répondeurs : 5 cas étaient négatifs pour l'expression par les cellules tumorales du PD-L1 (soit 5 cas concordants sur 10) et 5 cas étaient positifs pour l'expression par les cellules tumorales du PD-L1 (soit 5 cas discordants sur 10) (détail des résultats dans le tableau 6).

Tableau 6. Statut PD-L1 des cellules tumorales et concordance ou discordance avec la réponse thérapeutique observée. Le seuil de positivité est fixé à 5% des cellules tumorales positives pour PD-L1. Gris clair = tumeurs PD-L1 négatives ; gris foncé = tumeurs PD-L1 positives ; jaune = discordances entre statut PD-L1 et réponse observée aux anti-PD-1 ; M = métastase cutanée ; G = ganglion métastatique ; se = métastase mammaire ; NR = non réponse ; R = réponse ; RC = réponse complète ; RP = réponse partielle ; RP = réponse dissociée ; RS = maladie stable.

Patient	Site	Mutation	%Cell T+	Réponse
BOR	M	BRAF	0	NR
DEM	M	WT	0	NR
LUU	M	BRAF	0	NR
MOL	G	WT	0	NR
PEL	M	WT	0	NR
RID	G	WT	0	NR
VER	G	WT	0	NR
MOR	G	NRAS	0	R (RC)
BEA	M	WT	0	R (RP)
BES	G	NRAS	0	R (RP-RD)
CAL	G	NRAS	0	R (RS-RD)
GAY	se	BRAF	0	R (RP)
PAN	M	BRAF	5	R (RC)
WIT	M	NRAS	5	R (RP)
LOR	M	WT	10	NR
RUB	G	WT	10	NR
LAS	M	NRAS	20	R (RS)
HIR	P	BRAF	30	NR
ARS	M	WT	50	NR
KYN	M	WT	100	R (RC)
MAR	G	NRAS+BRAF	100	R (RD)

La figure 16 ci-après synthétise les performances prédictives du test « PD-L1 tumoral », observées lorsqu'il est appliqué à notre série de cas, en termes de sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative.

Figure 16. Performances prédictives du marqueur PD-L1 tumoral dans notre série. Se = sensibilité ; Spe = spécificité ; VPP = valeur prédictive positive ; VPN = valeur prédictive négative.

	NR n = 11	R n = 10	
PDL1- n = 12	7	5	VPN = 58,3%
PDL1+ n = 9	4	5	VPP = 55,6%
	Spe = 63,6% Se = 50%		

Le test exact de Fisher ne montre pas, dans notre série, de différence significative entre le groupe «PD-L1 tumoral positif » et le groupe « PD-L1 tumoral négatif » concernant le nombre de patients répondeurs ($p = 0.6699$).

III.B.2 Qualitative : caractérisation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales

III.B.2.1 Distribution spatiale du marquage PD-L1

Différents profils d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ont été observés, notamment des marquages PD-L1 diffus et homogènes ou au contraire des marquages inhomogènes. Les marquages qualifiés d'inhomogènes pouvaient se présenter : soit sous la forme d'un gradient de positivité décroissant allant de la périphérie vers le centre de la tumeur, soit sous la forme de *foci* PD-L1 positifs.

Nous avons utilisé le terme « péritumoral » au lieu du terme « front d'invasion tumoral », ce dernier étant réservé aux tumeurs primitives.

Nous avons observé une distribution péritumorale exclusive ou majoritaire de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, de façon significativement plus fréquente chez les patients répondeurs ($p=0.048$) (figure 17).

Figure 17. Exemple de marquage péri-tumoral de PD-L1 par les cellules tumorales dans une métastase cutanée de mélanome.

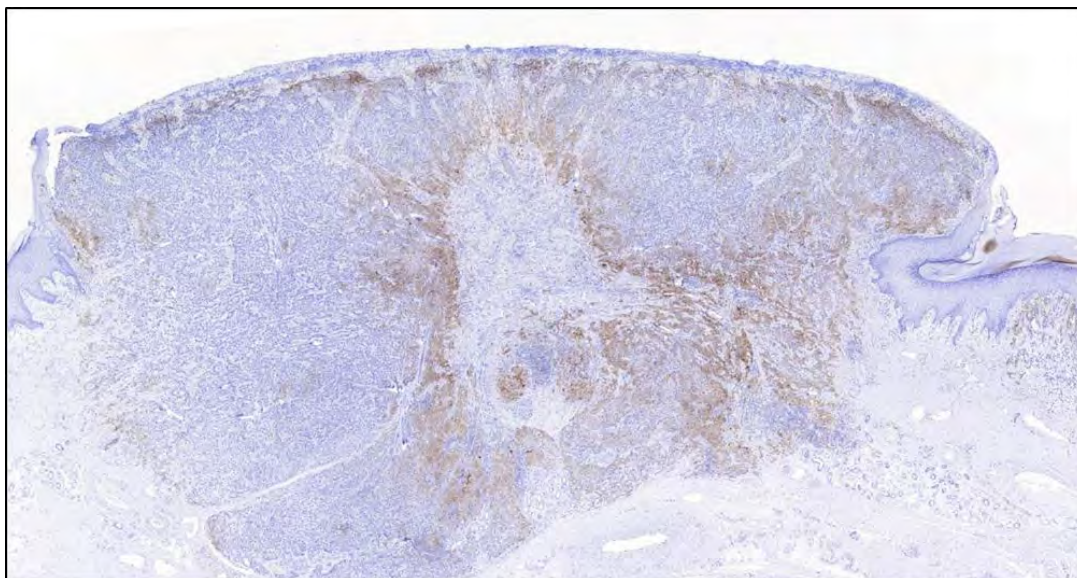
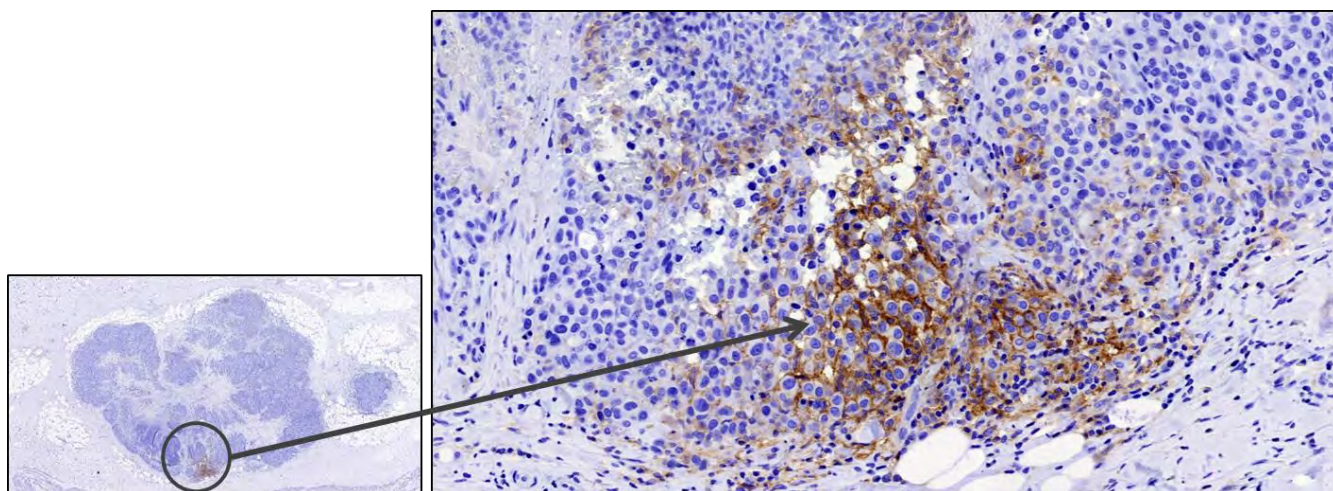
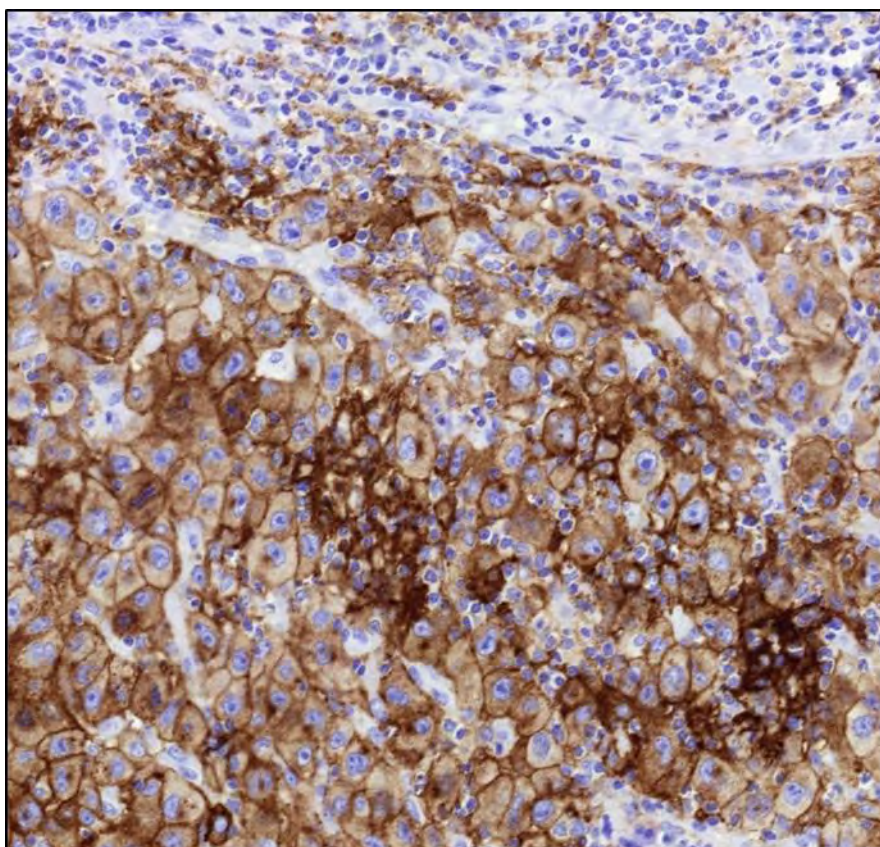
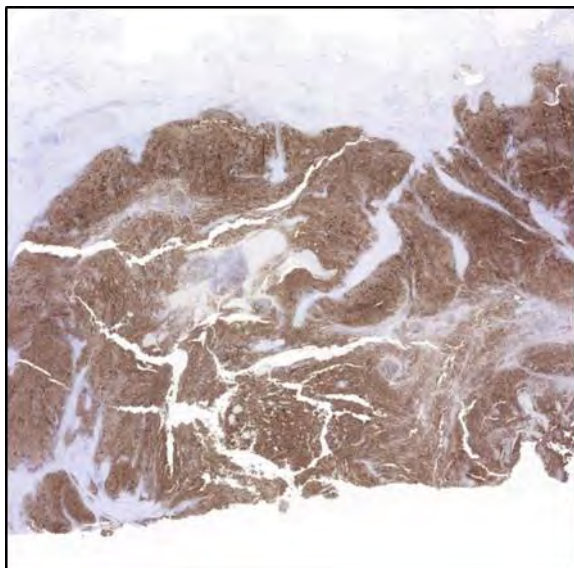


Figure 18. Exemple d'expression de PD-L1 intense, membranaire et focale, par les cellules tumorales (5% de la surface tumorale) dans un cas de réponse partielle.



Une expression homogène intense et pan-cellulaire de PD-L1 a été observée dans deux cas : une réponse complète et une réponse dissociée (figure 19).

Figure 19. Marquage à renforcement membranaire intense et diffus des cellules tumorales occupant 100% de la surface tumorale (cas de réponse dissociée).

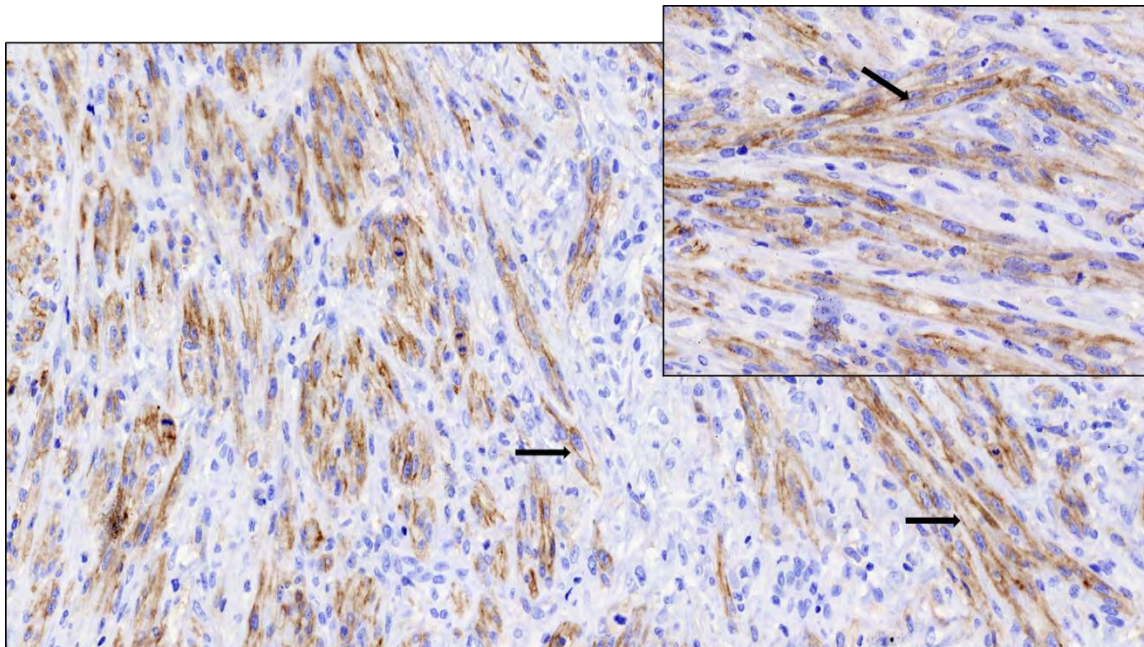


III.B.2.2 Distribution subcellulaire du marquage PD-L1

Dans la quasi-totalité des échantillons tumoraux PD-L1 positifs, l'expression de PD-L1 était exclusivement ou majoritairement de type membranaire (figures 18 et 19). Un cas de réponse complète présentait un marquage cytoplasmique de PD-L1.

Il s'agissait d'un cas de mélanome à cellules fusiformes pour lequel nous disposions de multiples échantillons échelonnés dans le temps. Nous avons observé de façon constante dans ce cas, un marquage cytoplasmique diffus des cellules tumorales concernant 100% des cellules tumorales. Dans les deux derniers échantillons cependant, prélevés après traitement par Ipilimumab et avant traitement par anti PD-1, est apparu focalement, un marquage membranaire de certaines cellules tumorales (figure 20).

Figure 20. Marquage modéré cytoplasmique et diffus des cellules tumorales, occupant 100% de la surface tumorale dans un cas de réponse complète d'un mélanome à cellules fusiformes associé à un marquage membranaire de certaines cellules tumorales (flèches).



III.B.2.3 Intensité du marquage PD-L1

Nous avons observé des intensités variables d'immunomarquages PD-L1 (évalués par calcul du H-Score), sans avoir pu mettre en évidence d'association significative avec les profils de réponse aux anti-PD-1 (données non présentées).

III.C Evaluation de la valeur prédictive d'une expression multi-composante, micro-environnementale et tumorale de l'expression de PD-L1

Nous avons évalué l'intérêt de compléter l'évaluation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, par l'ajout de 2 critères complémentaires, afin d'améliorer la valeur prédictive de ce marquage.

Nous avons initialement mesuré la valeur prédictive d'un algorithme de lecture prenant en compte le contingent cellulaire tumoral et le contingent cellulaire micro-environnemental des cellules PD-L1 positives.

Nous avons donc effectué une première analyse avec le facteur prédictif princeps « expression tumorale de PD-L1 » et un seul facteur additionnel : l' « expression micro-environnementale de PD-L1 ».

Cette première analyse a suggéré que l'expression tumorale de PD-L1 est associée à la réponse aux anti-PD-1 et que l'expression micro-environnementale de PD-L1 est associée à la non réponse aux anti-PD-1.

Cette corrélation était cependant imparfaite, notamment en raison de cas « PD-L1 micro-environnemental » positifs répondeurs, étrangement tous mutés pour NRAS.

Nous avons donc secondairement pris en compte le statut mutationnel NRAS, que nous avons rajouté comme second facteur additionnel à notre algorithme de prédiction.

Au final nous avons donc pris en compte les trois paramètres suivant définis comme suit :

- l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ou « PD-L1 tumoral » ; avec un seuil de positivité supérieur ou égal à 5% des cellules tumorales ; le « PD-L1 tumoral » a aussi été quantifié en pourcentage de surface tumorale totale.
- l'expression de PD-L1 par les éléments nucléés du micro-environnement (quelle que soit leur nature) ou « PD-L1 micro-environnemental » ; avec un seuil de positivité supérieur ou égal à 1% de la surface tumorale totale. La quantification en pourcentage de surface tumorale a été choisie comme critère de quantification car :
 - o elle facilite la quantification du micro-environnement PD-L1 positif, en intégrant la multiplicité des types cellulaires PD-L1 positifs dans le micro-environnement ;
 - o le mode de quantification commun pour le « PD-L1 tumoral » et le « PD-L1 micro-environnemental » autorise leur comparaison. En effet le ratio « PD-L1 tumoral sur PD-L1 micro-environnemental » nous a semblé important à prendre en compte, étant donné les significations prédictives opposées de ces deux contingents cellulaires dans les cas non mutés NRAS.
- le statut mutationnel NRAS : les mutations du codon 61 de NRAS étant détectées en biologie moléculaire.

Nous avons au final testé un algorithme de prédiction intégrant ces trois facteurs selon l'ordre hiérarchique suivant : 1) le PD-L1 tumoral, 2) le PD-L1 micro-environnemental, 3) le statut mutationnel NRAS.

III.C.1 Performances de l'algorithme de prédiction prenant en compte l'expression bi-composante de PD-L1 et le statut mutationnel

Après application de notre algorithme de lecture de l'expression de PD-L1, nous avons obtenu les résultats suivants (tableau 7) : sur les 21 cas, 4 discordances au total, entre la réponse prédite et la réponse observée (contre 9 discordances sur 21 cas en utilisant le marqueur PD-L1 tumoral simple cf. chapitre précédent).

L'algorithme a permis une nette amélioration des deux valeurs prédictives :

- La valeur prédictive négative passant de 58.3% à 81.8% soit un gain de 23.5%,
- La valeur prédictive positive passant de 55.6% à 80% soit un gain de 24.4%.

L'algorithme a également permis de reclasser correctement un cas de réponse complète.

Tableau 7. Détail de la valeur prédictive de l'algorithme de lecture de l'expression du PD-L1. Gris clair = tumeurs PD-L1 négatives ; gris foncé = tumeurs PD-L1 positives ; jaune = discordances entre la prédiction de l'algorithme et la réponse observée aux anti-PD-1 ; M = métastase cutanée ; G = ganglion métastatique ; se = métastase mammaire ; T+ = expression de PD-L1 par les cellules tumorales ; T- = absence d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ; ME+ = expression de PD-L1 par les cellules du micro-environnement ; ME- = absence d'expression de PD-L1 par les cellules du micro-environnement ; NRAS+ = présence d'une mutation NRAS ; NRAS- = absence de mutation NRAS ; NR = non réponse ; R = réponse ; RC = réponse complète ; RP = réponse partielle ; RP = réponse dissociée ; RS = maladie stable.

Patient	Site	Mutation	%Cell T+	%surf T+	%surf ME+	T+/ME+	Paramètres de l'algorithme	Réponse prédite	Réponse observée
BOR	M	BRAF	0	0	30	0	(T-) (ME+) (NRAS-)	NR	NR
DEM	M	WT	0	0	1	0	(T-) (ME+) (NRAS-)	NR	NR
LUU	M	BRAF	0	0	0,5	0	(T-) (ME-)	NR	NR
MOL	G	WT	0	0	11	0	(T-) (ME+) (NRAS-)	NR	NR
PEL	M	WT	0	0	0,5	0	(T-) (ME-)	NR	NR
RID	G	WT	0	0	40	0	(T-) (ME+) (NRAS-)	NR	NR
VER	G	WT	0	0	3	0	(T-) (ME+) (NRAS-)	NR	NR
MOR	G	NRAS	0	0	20	0	(T-) (ME+) (NRAS+)	R	R (RC)
BEA	M	WT	0	0	0	0/0	(T-) (ME-)	NR	R (RP)
BES	G	NRAS	0	0	1	0	(T-) (ME+) (NRAS+)	R	R (RP-RD)
CAL	G	NRAS	0	0	1	0	(T-) (ME+) (NRAS+)	R	R (RS-RD)
GAY	se	BRAF	0	0	0	0/0	(T-) (ME-)	NR	R (RP)
PAN	M	BRAF	5	5	2	2,5	(T+) (ME+) (T+>ME+)	R	R (RC)
WIT	M	NRAS	5	2	0,5	4,0	(T+) (ME+) (T+>ME+)	R	R (RP)
LOR	M	WT	10	10	0	10/0	(T+) (ME-)	R	NR
RUB	G	WT	10	10	21	0,5	(T+) (ME+) (T+<ME+) (NRAS-)	NR	NR
LAS	M	NRAS	20	10	30	0,3	(T+) (ME+) (T+<ME+) (NRAS+)	R	R (RS)
HIR	P	BRAF	30	20	45	0,4	(T+) (ME+) (T+<ME+) (NRAS-)	NR	NR
ARS	M	WT	50	50	1	50,0	(T+) (ME+) (T+>ME+)	R	NR
KYN	M	WT	100	90	11	8,2	(T+) (ME+) (T+>ME+)	R	R (RC)
MAR	G	NRAS/BRAF	100	100	32	3,1	(T+) (ME+) (T+>ME+)	R	R (RD)

Figure 21. Performances prédictives de l'algorithme proposé.

Algorithme + : prédiction de réponse par l'algorithme ; Algorithme - : prédiction de non réponse par l'algorithme ; R : réponse à l'anti-PD-1 ; NR : non réponse à l'anti-PD-1.

	NR n = 11	R n = 10	
Algorithme - n = 11	9	2	VPN = 81,8%
Algorithme + n = 10	2	8	VPP = 80%
Spe = 81,8% Se = 80%			

Si nous comparons les performances prédictives de l'algorithme (figure 21), avec celles de la simple expression tumorale du PD-L1 (figure 16), nous observons avec l'algorithme, une nette amélioration des valeurs prédictives positive et négative :

- la valeur prédictive positive passant de 55.6% à 80% ;
- la valeur prédictive négative passant de 58.3% à 81.8%.

Le test exact de Fisher confirme une différence significative du nombre de patients répondeurs entre le groupe « prédiction de réponse par l'algorithme » et le groupe « prédiction de non réponse par l'algorithme » ($p = 0.0089$).

III.C.2 Dynamique spatiale et temporelle du profil d'expression bi-composante de PD-L1

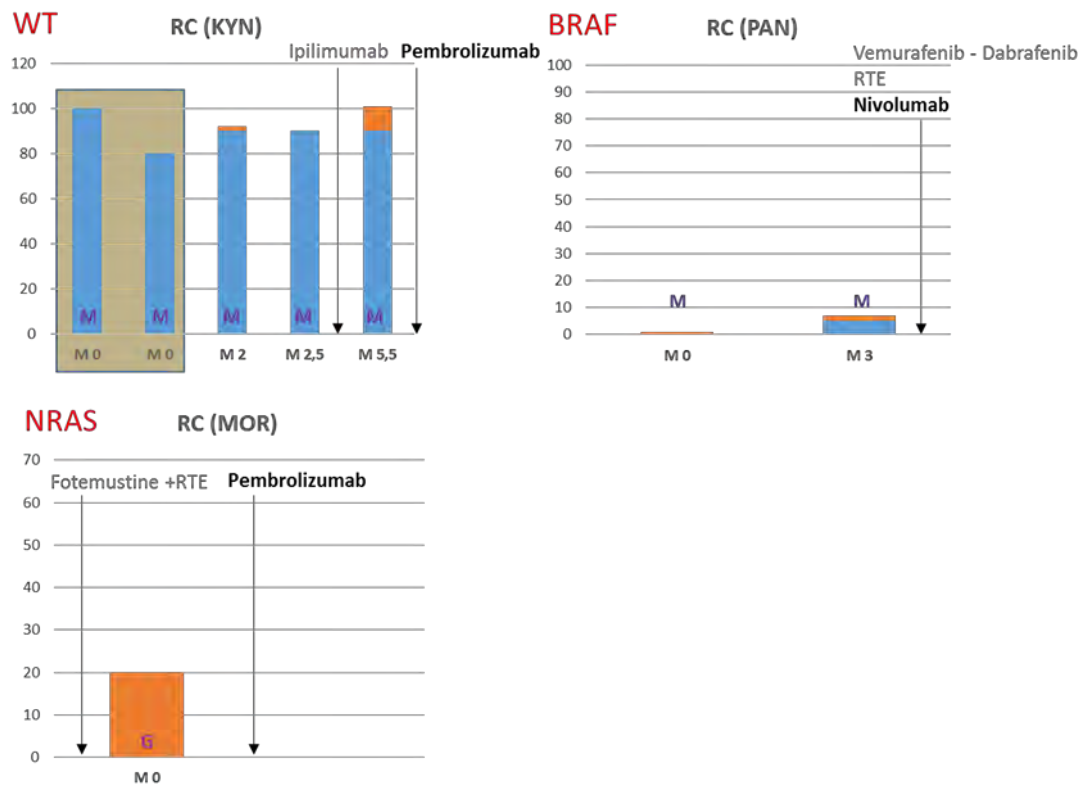
Comme précédemment rapporté dans la littérature, nous avons observé une grande variabilité inter- et intra-individuelle de l'expression tumorale et micro-environnementale PD-L1, ne nous permettant pas de mettre en évidence une éventuelle évolution temporelle ou spatiale stéréotypée caractérisant un profil de réponse aux anti-PD-1.

Chez les non répondeurs en revanche (tous NRAS sauvages dans notre série), nous avons observé une étonnante constance du profil d'expression de PD-L1, caractérisé par une expression tumorale constamment négative ou inférieure à l'expression micro-environnementale (chez 9 patients non répondeurs sur les 11) (cf. figure 22 ci-dessous).

Une observation de ce type n'a à notre connaissance jamais été rapportée dans la littérature, les quelques publications ayant évalué la variation spatio-temporelle de PD-L1 au cours de l'évolution de la maladie ne s'étant quasi-exclusivement intéressé qu'à la variation du PD-L1 tumoral.

Figure 22. a Evolution spatio-temporelle du profil d'expression bi-composant de PD-L1 : par les cellules tumorales (en bleu) et du micro-environnement (en orange). Une échelle temporelle relative exprimée en mois apparaît en abscisses (« M0 » étant le temps zéro ou « Mois 0 » correspondant au temps du 1er échantillon analysé) ; lorsque différents échantillons appartenant au même prélèvement ont été analysés, ces derniers apparaissent dans le même cadre. Les prélèvements encadrés avec un anti-PD-1 ont été réalisés sous anti-PD-1. Les surfaces occupées par les cellules tumorales et micro-environnementales PD-L1 positives apparaissent en ordonnées.

REPONSES COMPLETES



REPONSES PARTIELLES

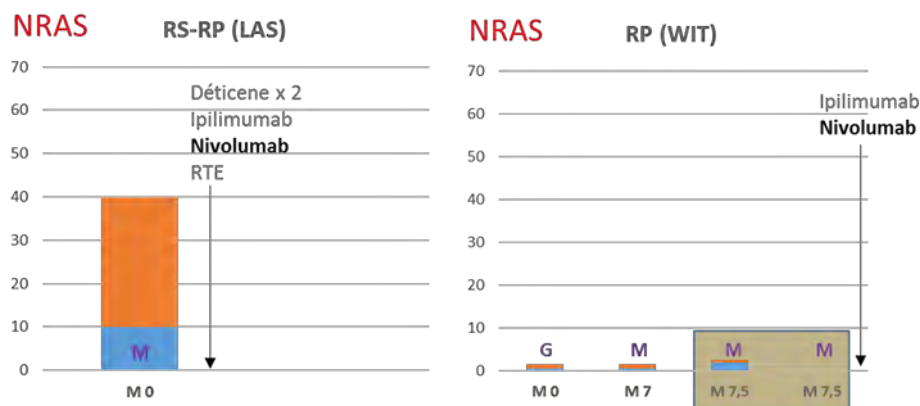
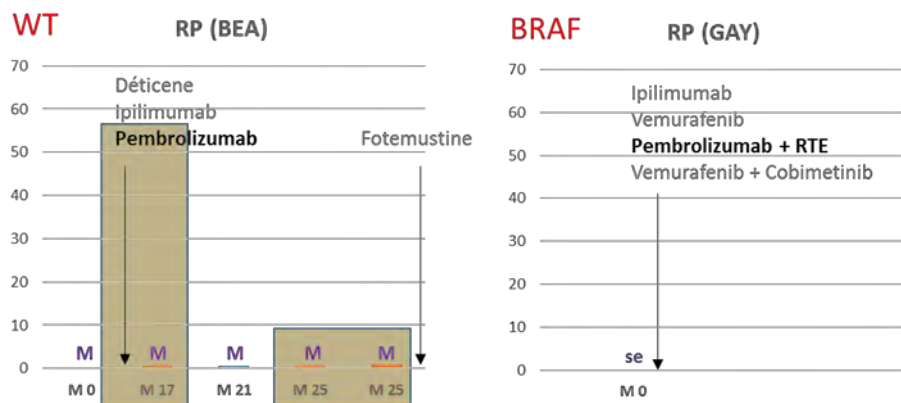


Figure 22. b

REPONSES PARTIELLES



REPONSES DISSOCIEES

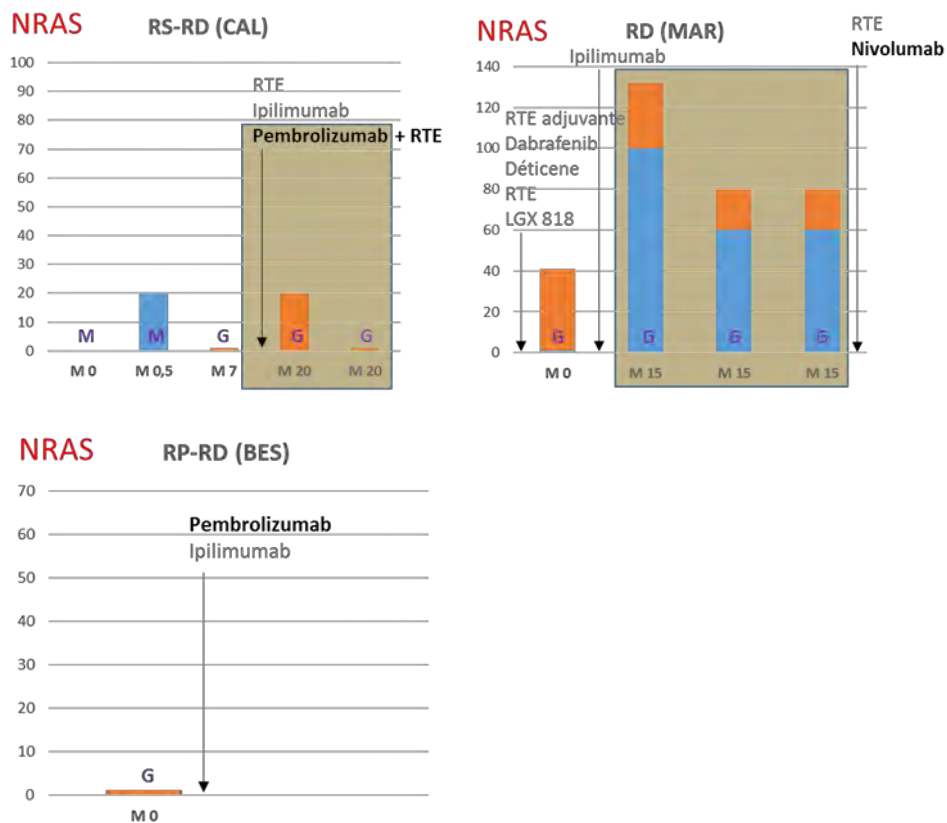


Figure 22. c

NON REPONDEURS

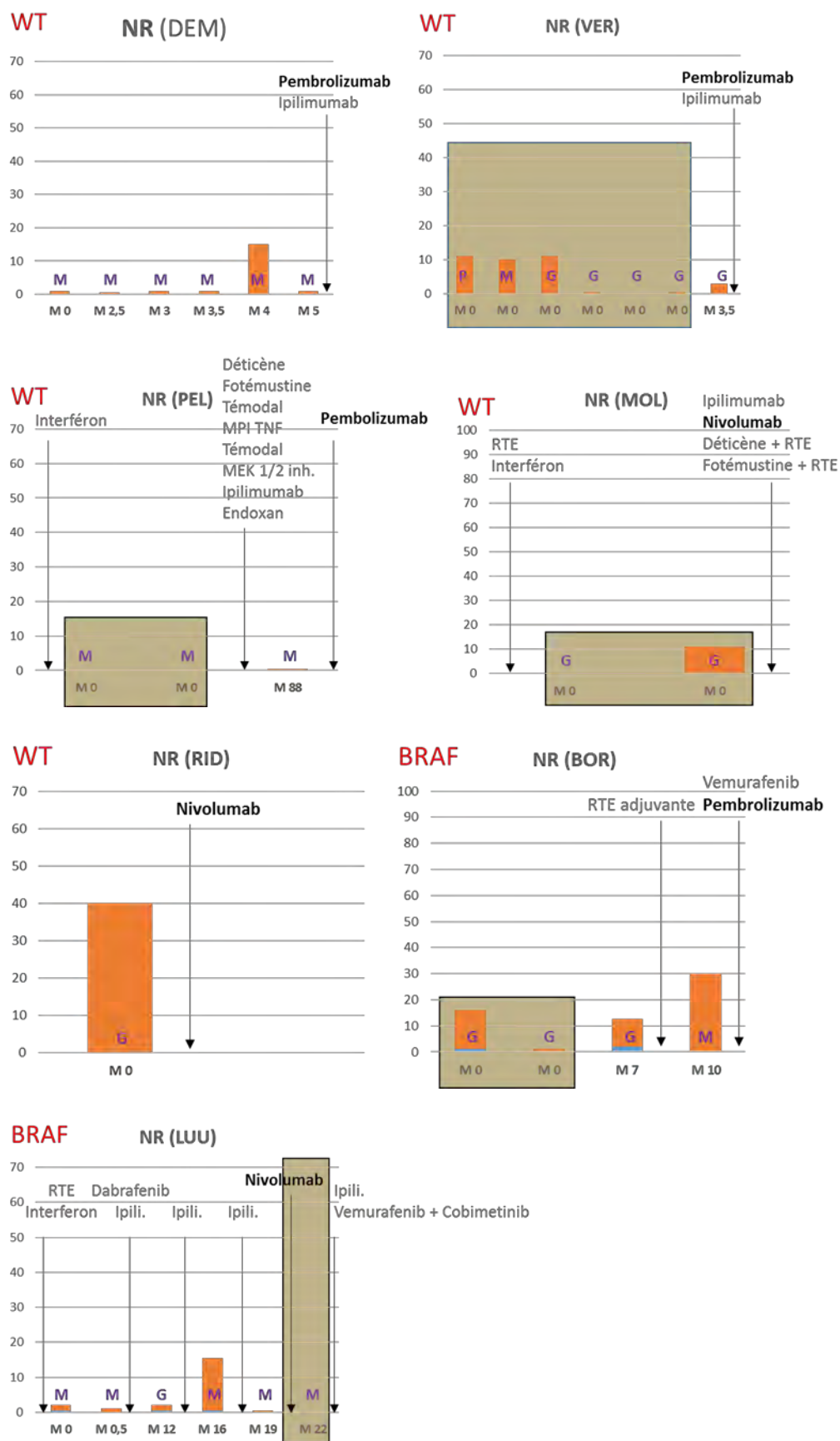
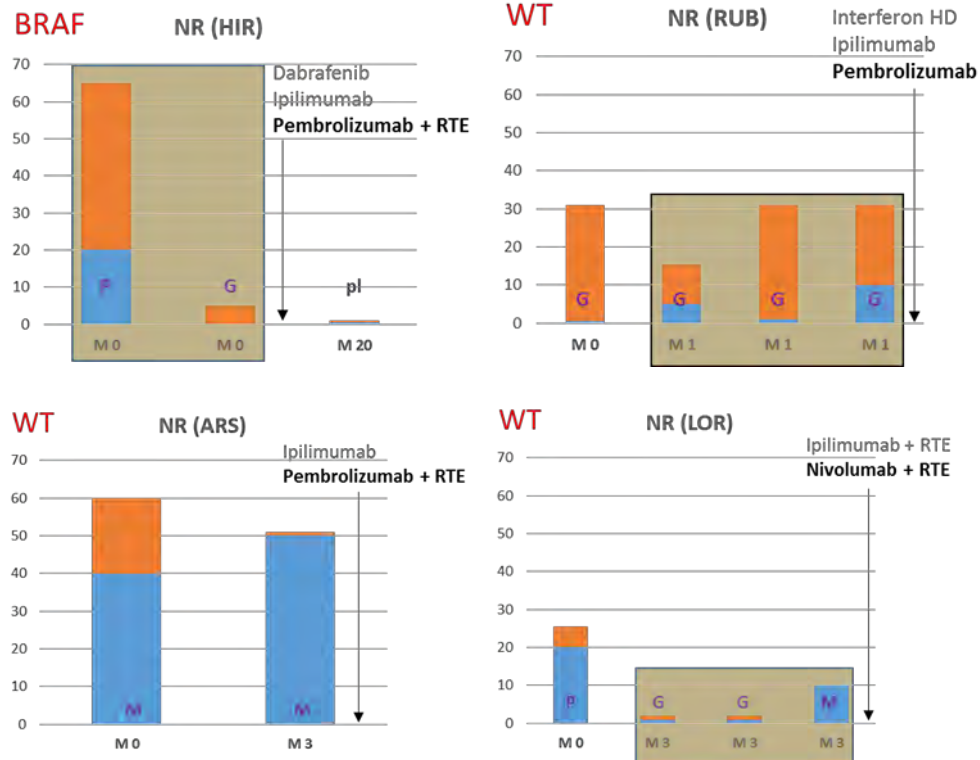


Figure 22. d

NON REPONDEURS



III.C.3 Analyses exploratoires sur la nature et l'effet des macrophages exprimant PD-L1

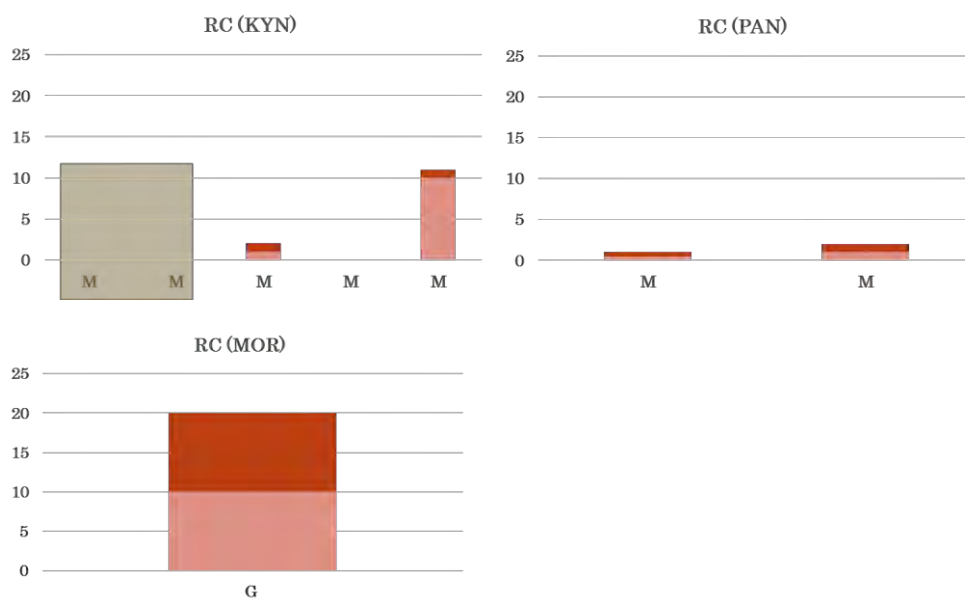
III.C.3.1 Le micro-environnement PD-L1 positif est essentiellement constitué de macrophages PD-L1 positifs.

Ci-dessous la description de la composition du micro-environnement PD-L1 positif (figure 23). En regardant l'ensemble des échantillons analysés pour chaque patient, nous remarquons que dans la très grande majorité des échantillons, les macrophages prédominent. A noter que les autres cellules PD-L1+ du micro-environnement correspondent à des cellules d'« allure lymphoïde », dont la nature reste à préciser (il peut en effet également s'agir de cellules de la lignée myéloïde comme rapporté dans la littérature (réf), mais également de lymphocytes B ou de plasmocytes).

Figure 23. a Détail du micro-environnement PD-L1 positif : mise en évidence de la composante macrophagique PD-L1 positive ; les échantillons encadrés ensemble font partie du même prélèvement, les prélèvements encadrés avec un anti-PD-1 ont été réalisés sous anti-PD-1.

En rose = macrophages PD-L1 positifs ; en orange = cellules d'allure lymphoïde PD-L1 positives.

REPONSES COMPLETES



REPONSES PARTIELLES

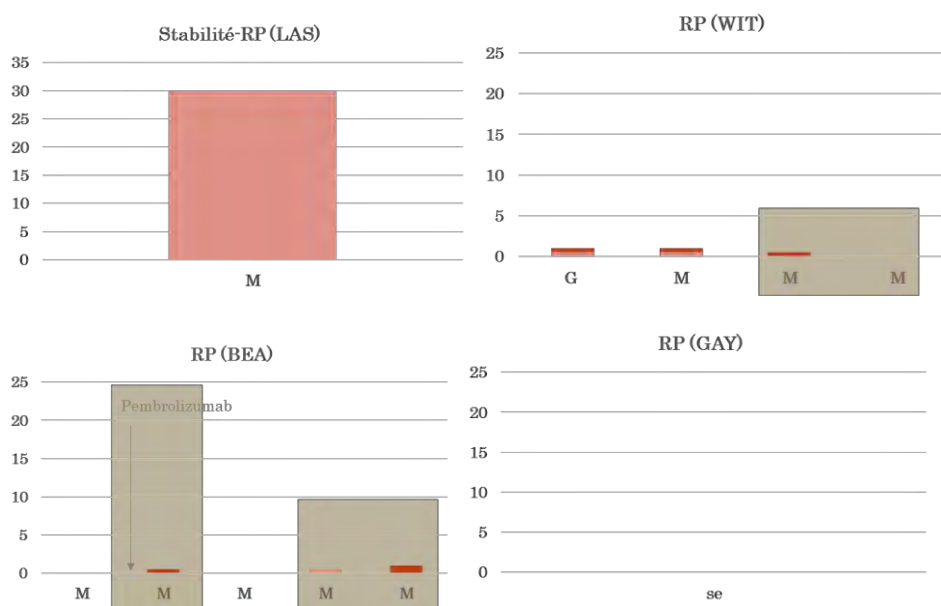
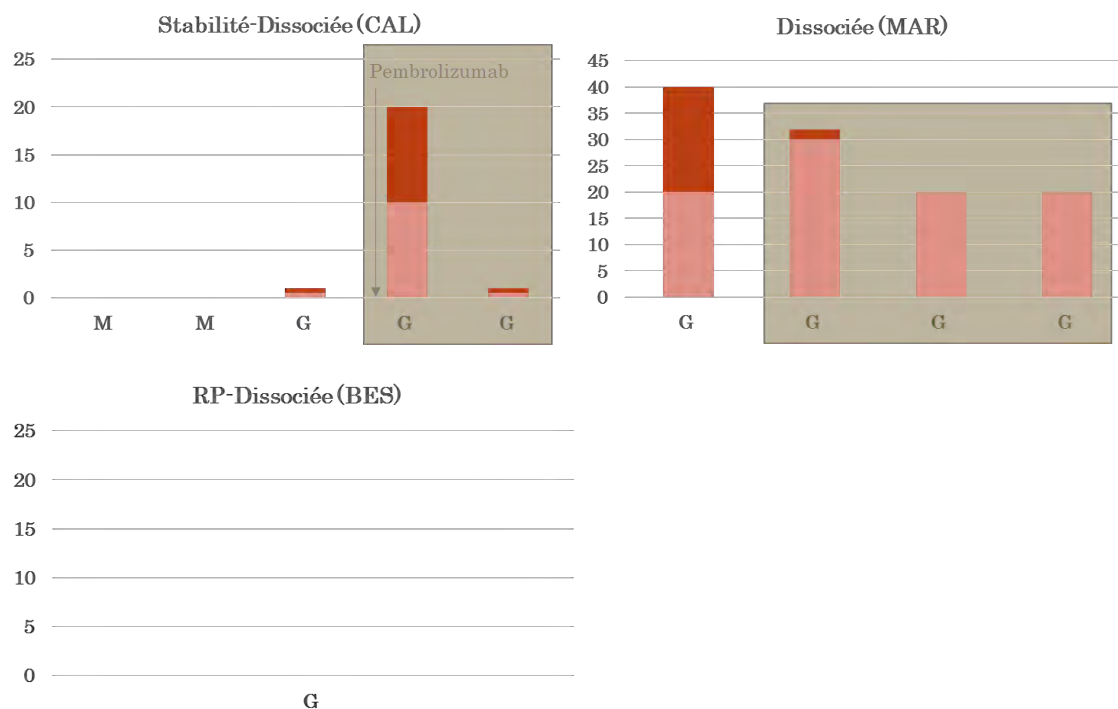


Figure 23. b

REPONSES DISSOCIEES



NON REPONDEURS

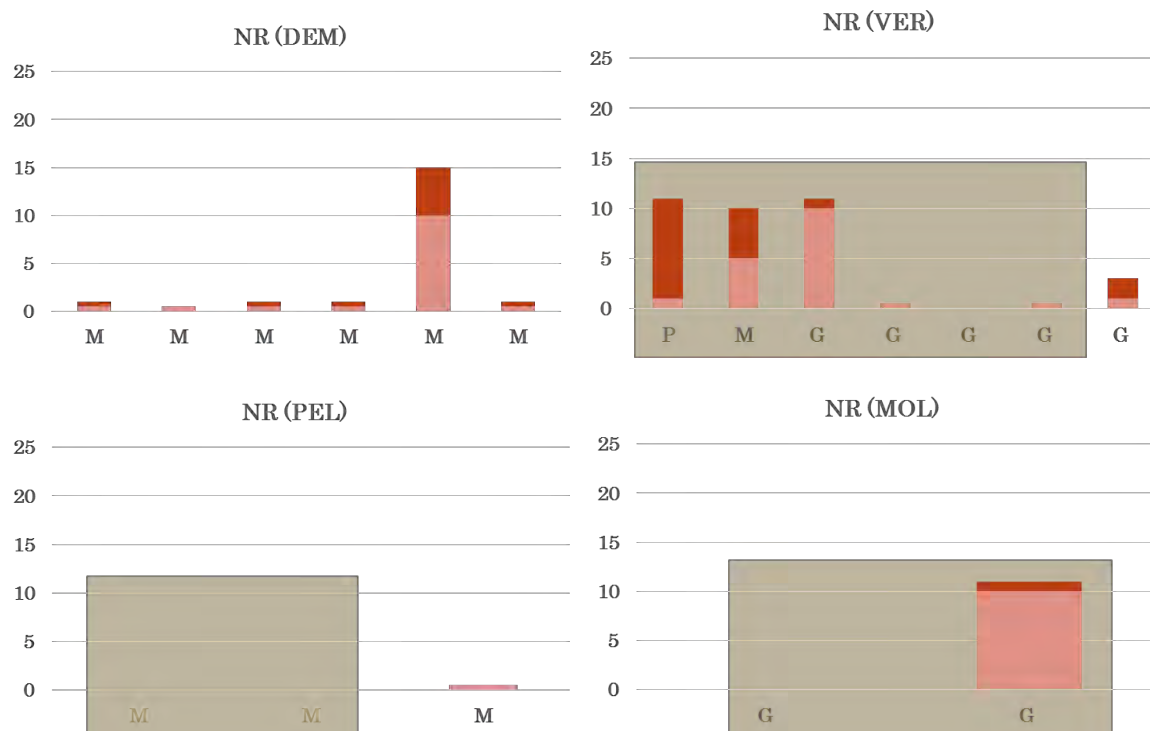


Figure 23. c

NON REPONDEURS



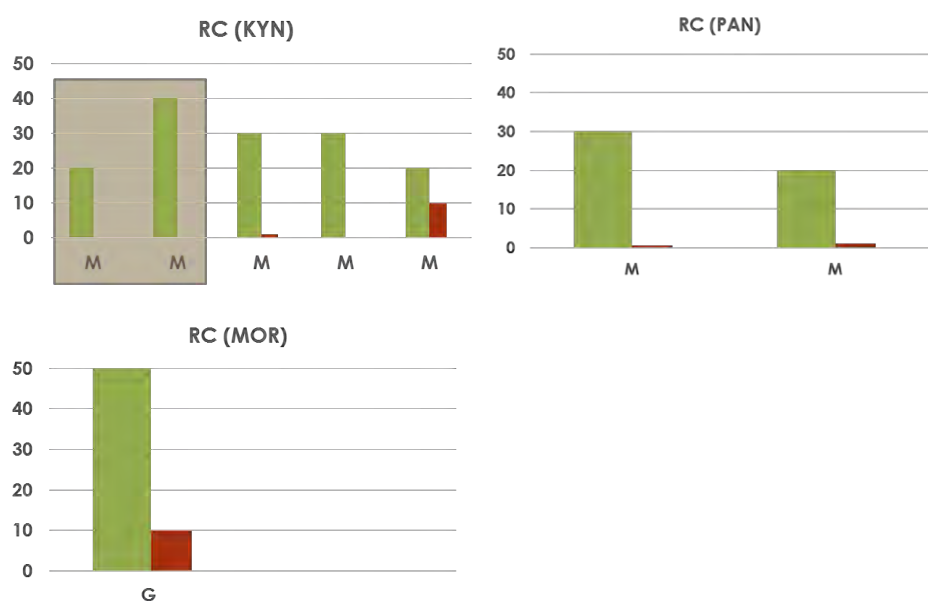
III.C.3.2 Il n'y a pas de corrélation évidente entre l'importance de l'infiltrat macrophagique PD-L1 positif et l'importance de l'infiltrat macrophagique M2 total.

Nous nous sommes ensuite demandé si l'absence de réponse le plus souvent constatée en cas de composante PD-L1 micro-environnementale prédominante (dans les mélanomes non mutés NRAS), essentiellement en lien avec la présence de macrophages PD-L1 positifs, n'était pas simplement en lien avec la présence d'un gros infiltrat macrophagique de type M2 CD163+, quelle que soit sa positivité pour PD-L1.

Nous avons donc regardé l'évolution spatiale et temporelle comparée de ces deux paramètres, afin de voir s'ils tendent ou non à évoluer de façon parallèle. Mis à part, peut-être, 2 patients non répondeurs, nos observations préliminaires infirment cette hypothèse, ne décrivant pas de tendance évolutive commune entre ces deux paramètres (cf. figure 24 ci-dessous).

Figure 24. a Evolutions spatiotemporelles comparées de l'infiltrat macrophagique M2 total en vert (CD163 positif, quel que soit le statut PD-L1, positif ou négatif), et de l'infiltrat macrophagique PD-L1 positif en marron.

REPONSES COMPLETES



REPONSES PARTIELLES

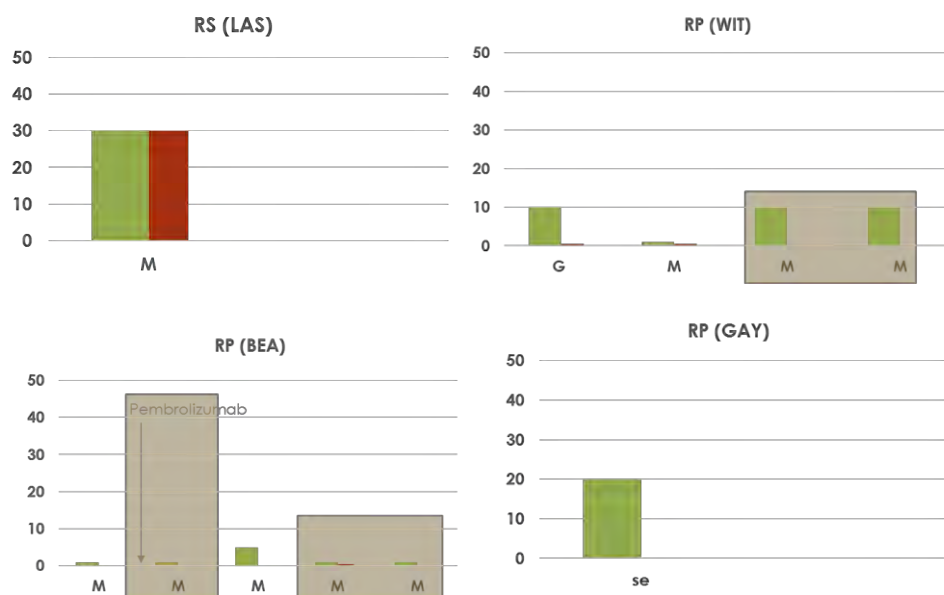
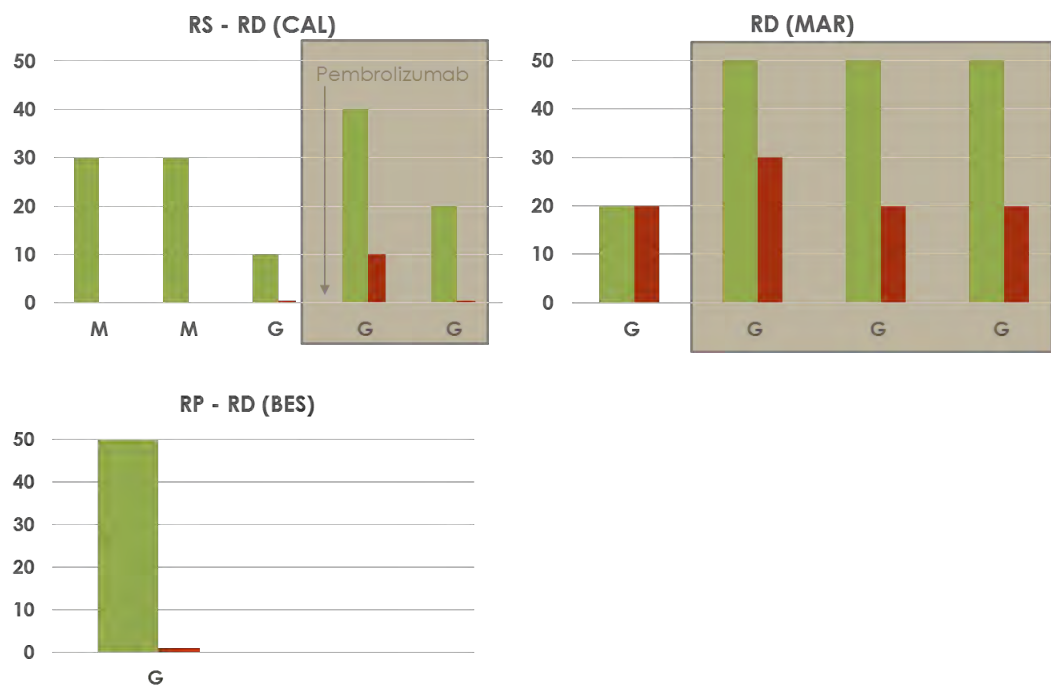


Figure 24. b

REPONSES DISSOCIEES



NON REPONDEURS

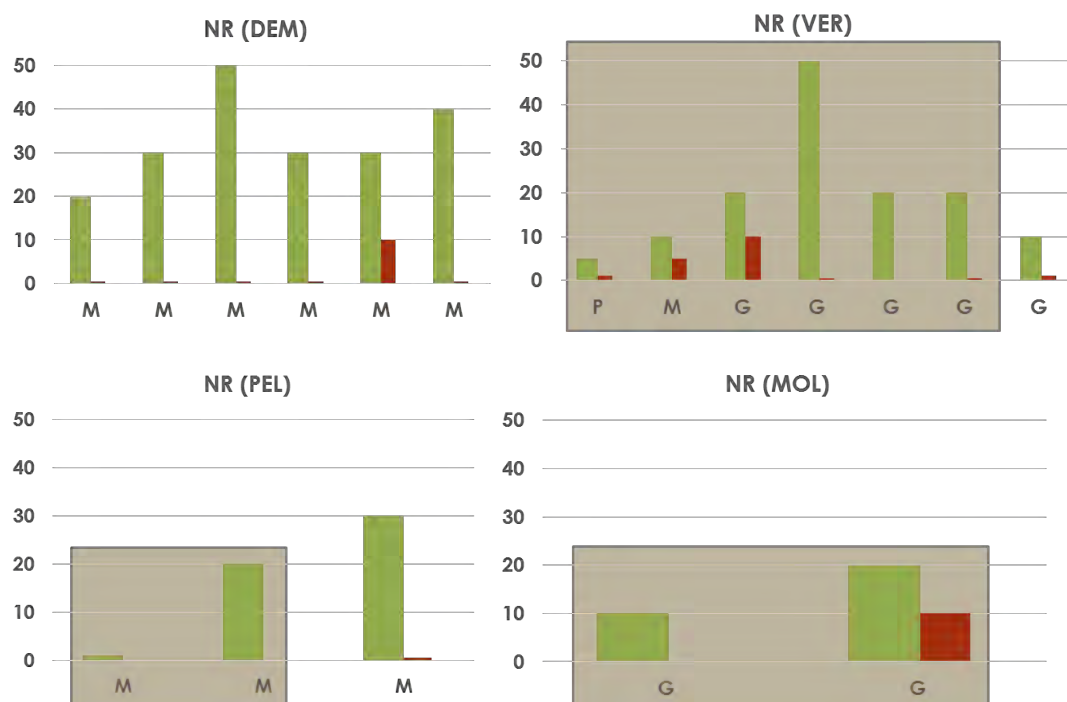
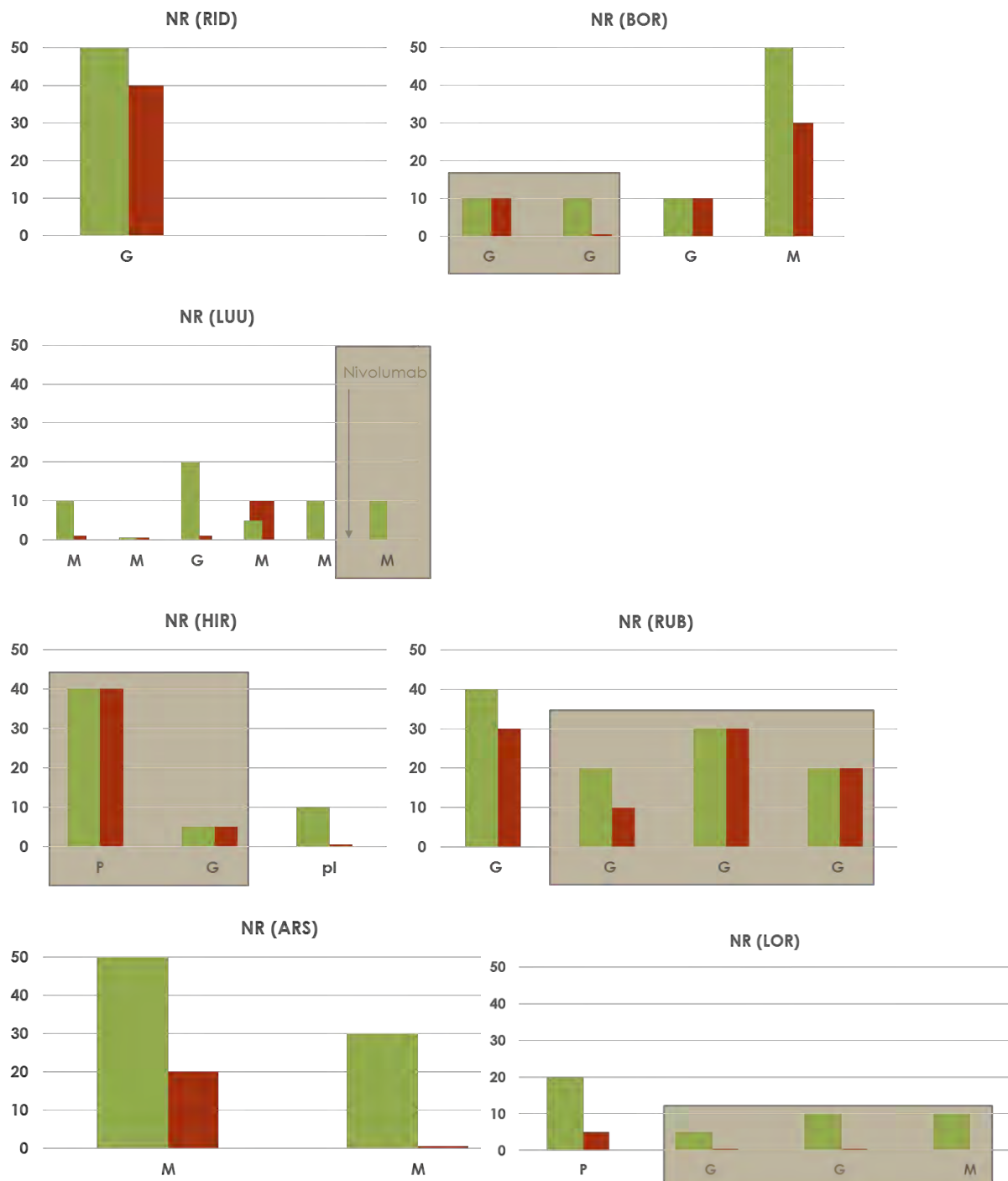


Figure 24. c

NON REPONDEURS



L'absence de corrélation évidente observée entre infiltrat macrophagique CD163 total et infiltrat macrophagique PD-L1 positif, suggère que l'absence de réponse le plus souvent constatée en cas d'expression de PD-L1 à composante micro-environnementale/macrophagique prédominante, n'est pas forcément en lien avec l'appartenance des macrophages PD-L1 positifs à une forte infiltration macrophagique M2 globale.

III.C.3.3 Tout comme les macrophages PD-L1+, la signification prédictive des macrophages CD163 totaux semble être liée au statut mutationnel NRAS du mélanome, suggérant un impact particulier de cette mutation oncogénique sur la sensibilité du micro-environnement macrophagique aux anti-PD-1.

Nous observons dans le tableau 8 ci-dessous que la présence d'un infiltrat macrophagique abondant, occupant plus de 30% de la surface tumorale totale, est systématiquement associée à l'absence de réponse, sauf dans les mélanomes mutés NRAS. Dans les mélanomes mutés NRAS en effet, la présence d'une forte infiltration macrophagique est à l'inverse systématiquement associée à une réponse.

Tableau 8. Quantification de l'infiltrat macrophagique total, estimé en pourcentage de surface tumorale totale infiltrée par des cellules CD163 positives. Gris clair = moins de 30% de la surface tumorale totale infiltrée par des cellules CD163 positives ; Gris foncé = 30% ou plus de la surface tumorale totale infiltrée par des cellules CD163 positives.

Patient	Site	Mutation	%surf CD163	Réponse
BEA	M	WT	1	R (RP)
LUU	M	BRAF	5	NR
CAL	G	NRAS	10	R (RS-RD)
LOR	M	WT	10	NR
VER	G	WT	10	NR
WIT	M	NRAS	10	R (RP)
KYN	M	WT	20	R (RC)
PAN	M	BRAF	20	R (RC)
GAY	se	BRAF	20	R (RP)
MOL	G	WT	20	NR
RUB	G	WT	20	NR
ARS	M	WT	30	NR
PEL	M	WT	30	NR
LAS	M	NRAS	30	R (RS)
DEM	M	WT	40	NR
HIR	P	WT	40	NR
BOR	M	BRAF	50	NR
RID	G	WT	50	NR
BES	G	NRAS	50	R (RP-RD)
MAR	G	NRAS+BRAF	50	R (RD)
MOR	G	NRAS	60	R (RC)

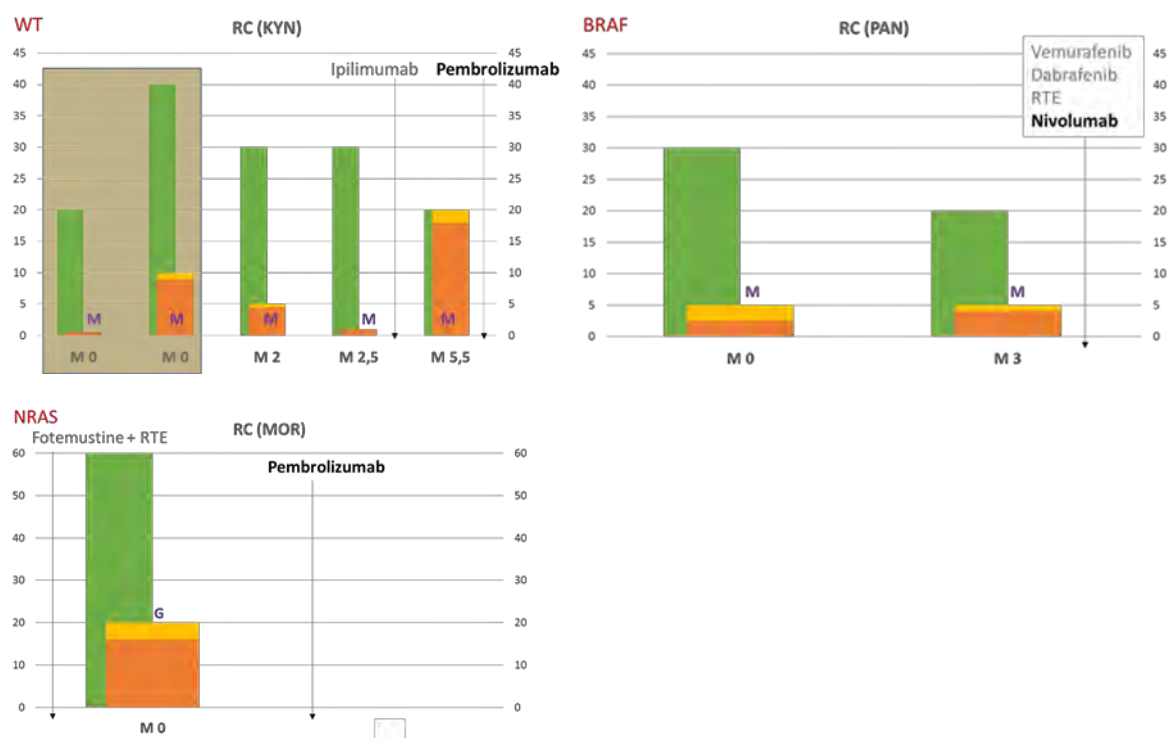
Nous ne pouvons en revanche rien dire des faibles infiltrats macrophagiques, qui ne semblent pas prédisposer à une réponse ou à une non-réponse aux anti-PD-1. Nous comptons en effet quasiment autant de réponses que de non-réponses parmi les échantillons avec faibles infiltrats macrophagiques.

III.C.3.4 L'effet péjoratif des macrophages dans les mélanomes non mutés NRAS est peut-être médié par un effet défavorable sur le priming lymphocytaire.

Lors de l'observation de l'évolution spatio-temporelle des différentes composantes du micro-environnement immunitaire, nous avons observé une corrélation entre l'augmentation du taux de macrophages CD163 positifs et l'augmentation du taux de lymphocytes T CD3 positif CD8 négatifs (cf. figure 25 ci-dessous), correspondant probablement à des lymphocytes T CD4, et au moins en partie à des lymphocytes T régulateurs étant donné le contexte tumoral.

Figure 25 a. Profils de variations spatiales et temporelles des infiltrats inflammatoires.
En orange : lymphocytes T CD3+ CD8- ; en jaune : lymphocytes T CD3+ CD8- ; en vert : macrophages CD163+.

REPONSES COMPLETES



REPONSES PARTIELLES

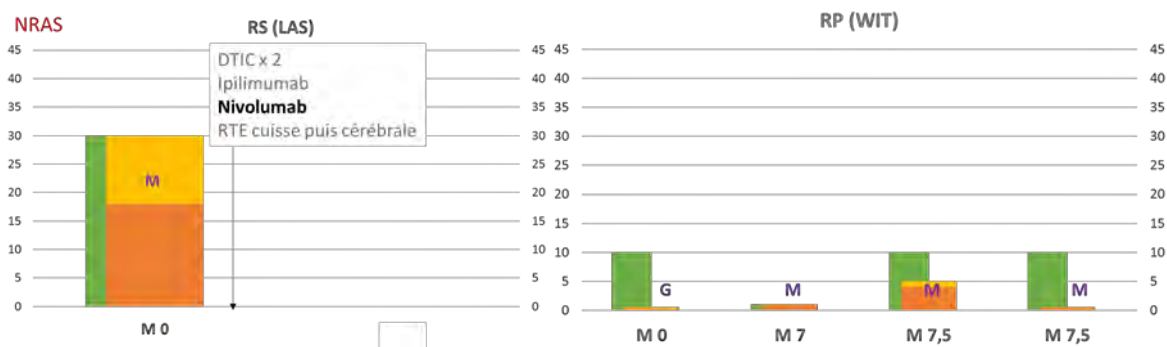
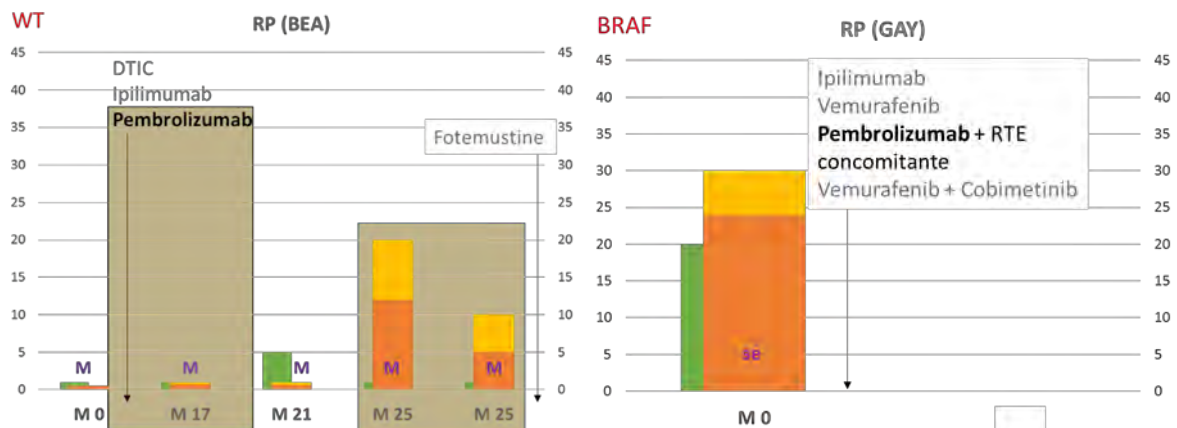


Figure 25. b

REPONSES PARTIELLES



REPONSES DISSOCIEES

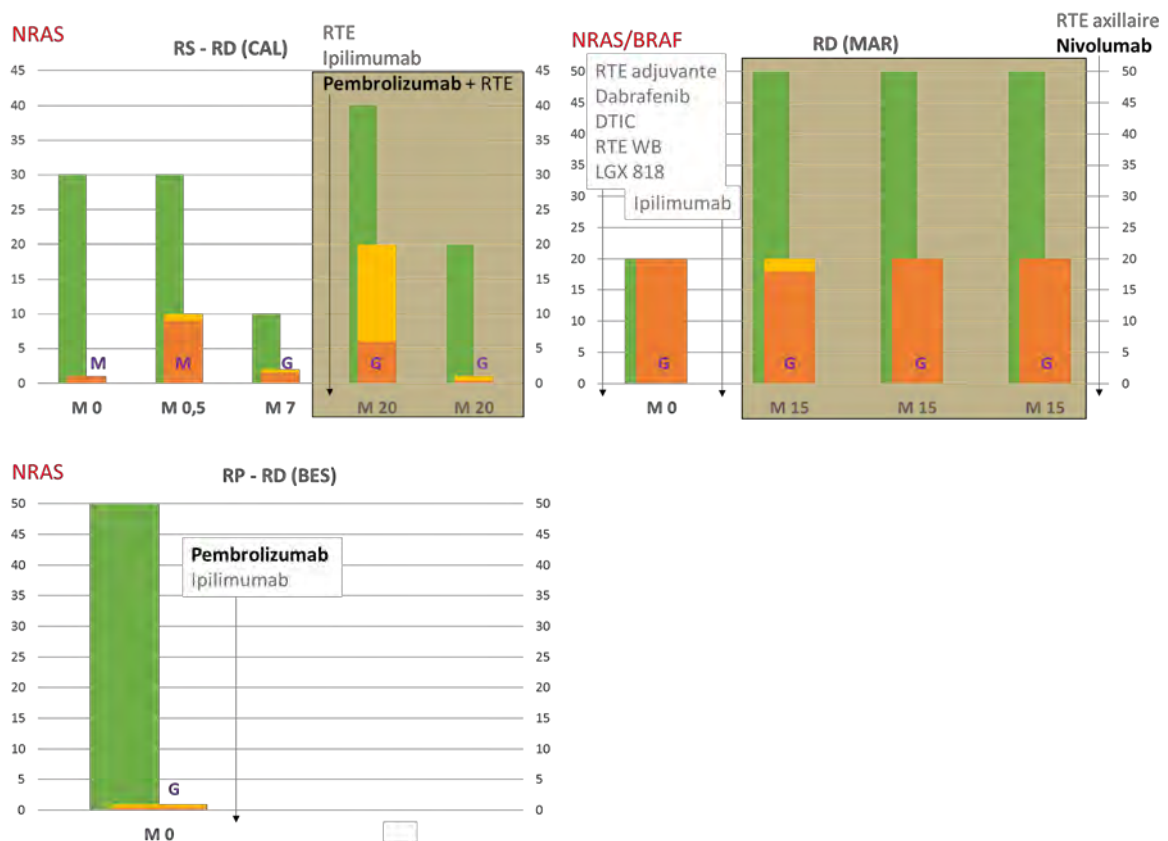


Figure 25. c

NON REPONDEURS

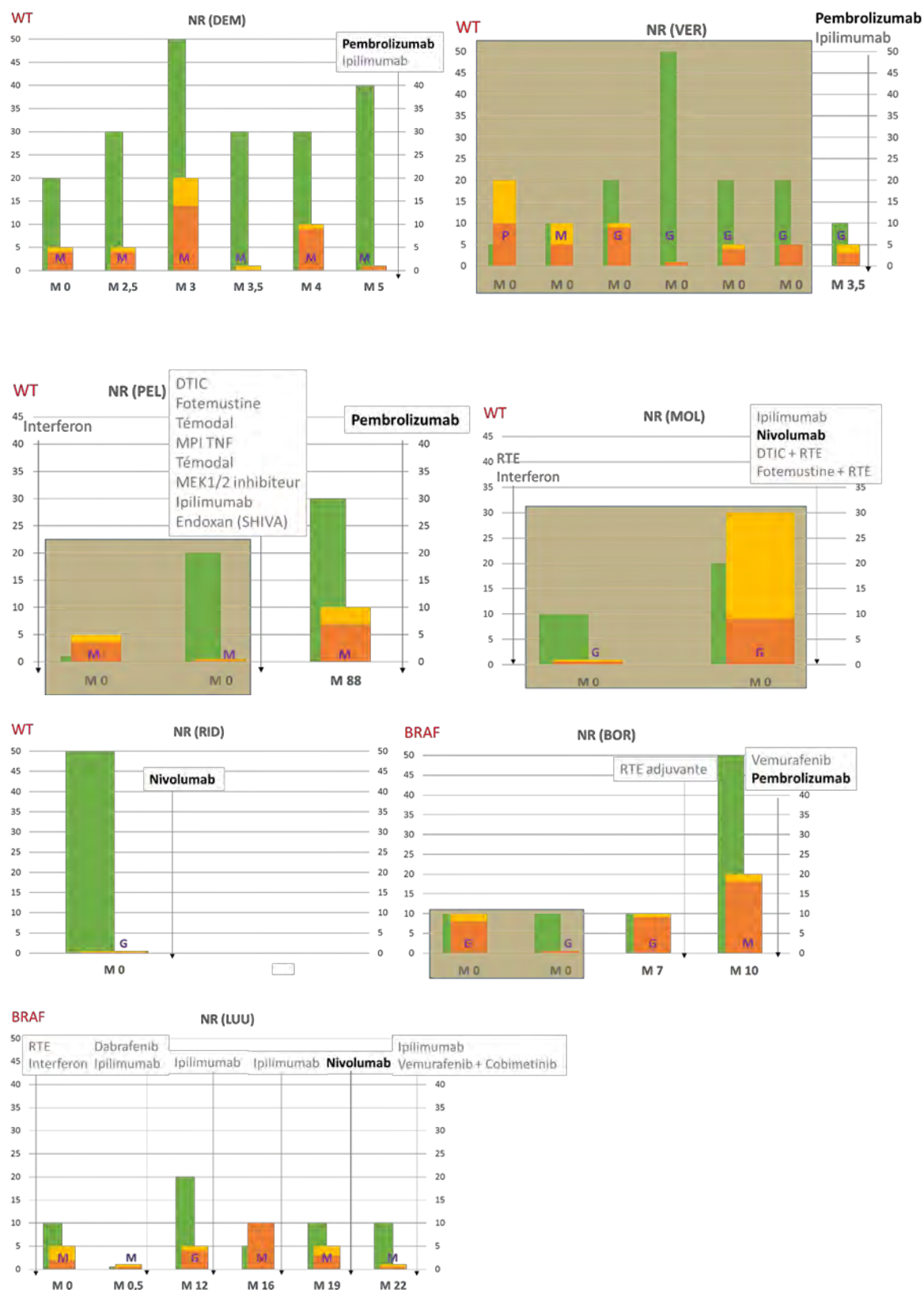
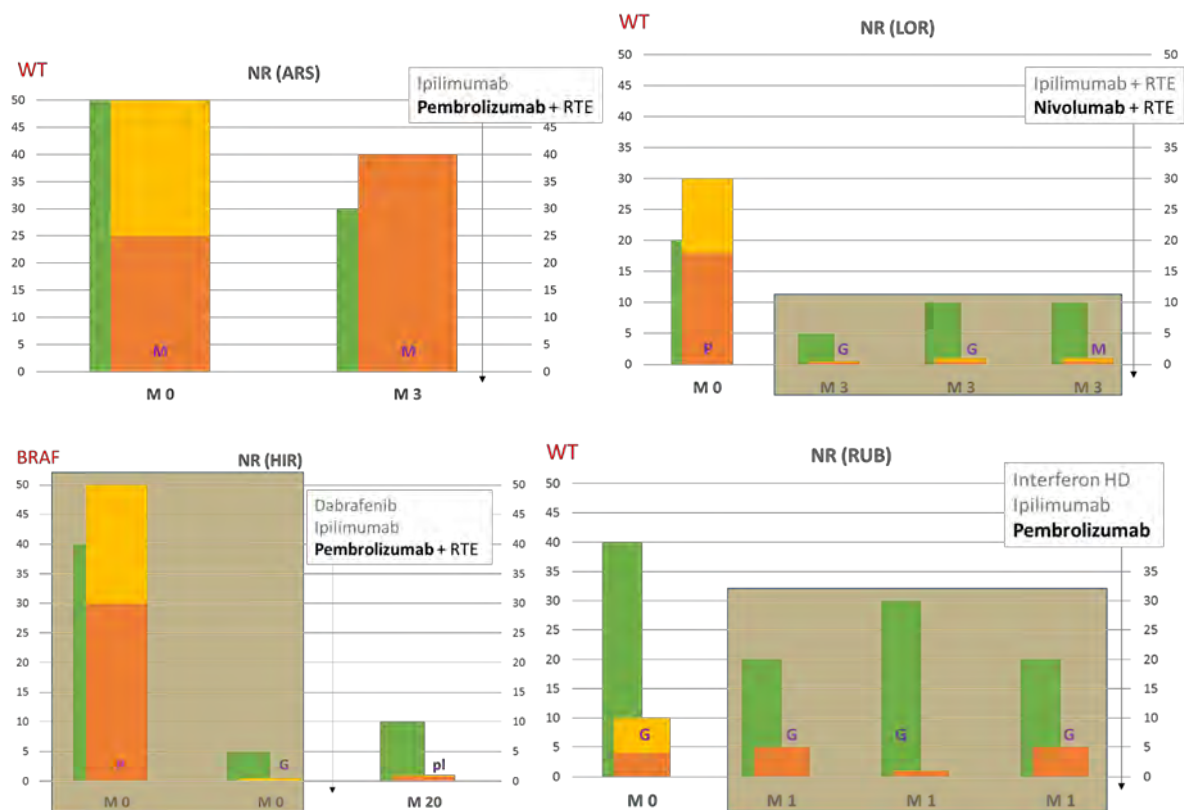


Figure 25. d

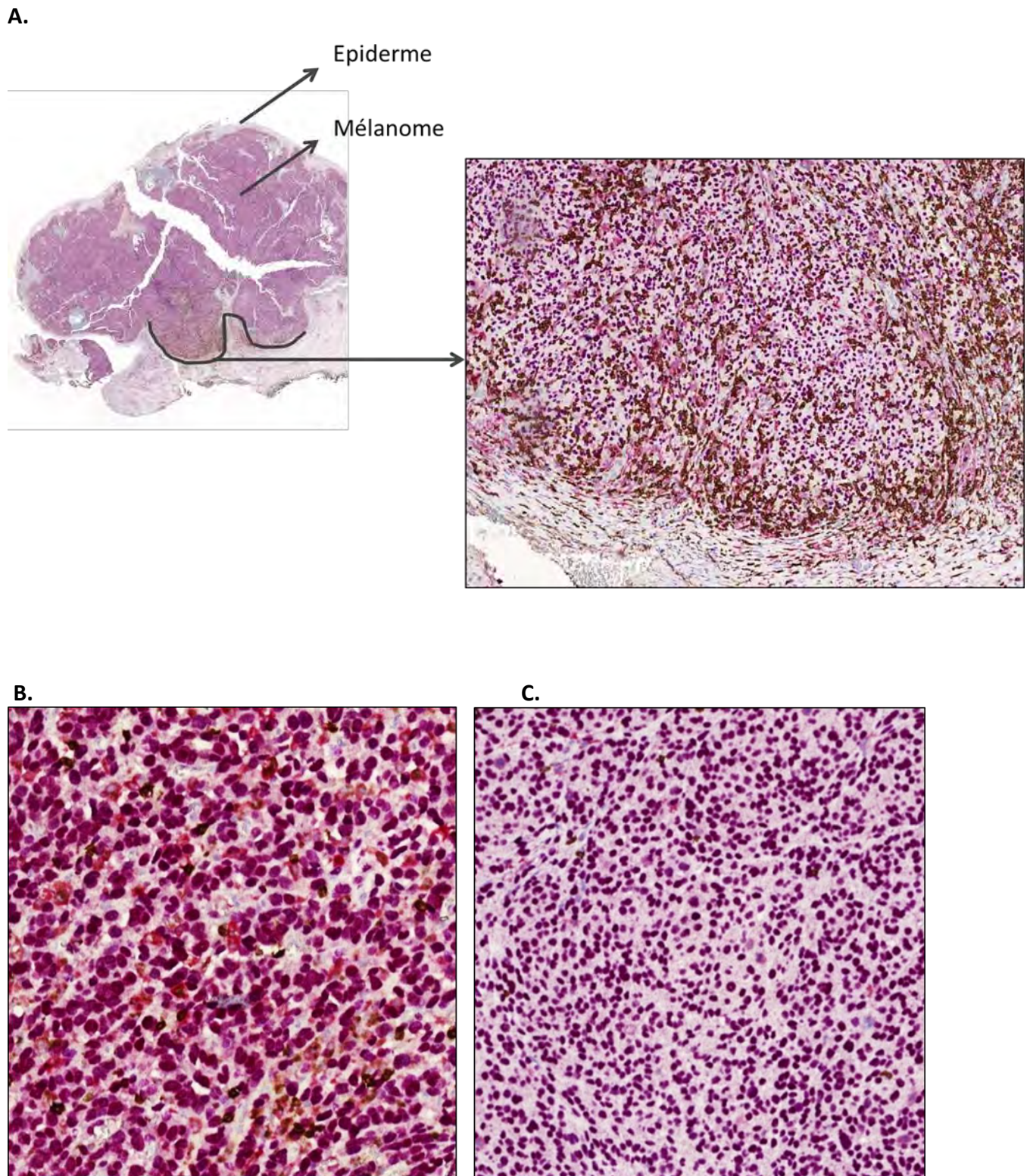
NON REPONDEURS



Cet effet négatif suspecté des macrophages M2 CD163+ sur le priming lymphocytaire est physiquement possible, puisque nous avons le plus souvent observé une colocalisation des infiltrats lymphocytaires et macrophagiques au moyen des triples marquages Sox10/CD8/CD163 (cf. figure 26 ci-dessous).

Figure 26. Colocalisation des infiltrats lymphocytaires et macrophagiques, visualisés au moyen des triples marquages Sox10/CD8/CD163 (les cellules tumorales ont des noyaux SOX10 mauve, les macrophages CD163+ apparaissent en rouge, et les lymphocytes CD8+ apparaissent en marron).

A. Les trois populations cellulaires apparaissent intriquées au front d'invasion tumoral (cas de patient non répondeur aux anti-PD-1). **B.** Lymphocytes et macrophages mêlés au front d'invasion **C.** Pas de lymphocytes et peu de macrophages ailleurs dans la tumeur.



III.C.3.5 Nous suspectons de plus une interaction entre les macrophages PD-L1 positifs et les cellules tumorales PD-L1 positives.

A l'occasion de difficultés techniques de lecture des immunomarquages PD-L1 dans certains cas (figures 27 et 28), où il était difficile de distinguer macrophages PD-L1 positifs et cellules tumorales PD-L1 positives, nous avons pu mettre en évidence, à l'aide des doubles marquages Sox10/PD-L1 et des triples marquages Sox10/CD8/CD163, la présence de macrophages PD-L1 positifs au niveau membranaire, présentant des prolongements dendritiques encerclant des cellules tumorales isolées ou groupées par trois ou quatre.

Figure 27. Cas de mélanome non muté NRAS ; non répondeur au traitement anti-PD-1.

A. Immunomarquage PD-L1 : macrophages CD163+ intra-tumoraux entourant les cellules tumorales, rendant très difficile de dire, qui des macrophages ou des cellules tumorales est positif. **B.** Double marquage Sox10/PD-L1, révélant que ce sont en réalité les macrophages qui sont PD-L1 positifs, car dans un nid de plusieurs cellules, on suit plus ou moins bien les membranes entre les cellules (flèches) alors que l'on a parfois l'impression que le marquage fait bien le tour d'une cellule tumorale (*), ce qui peut fausser la lecture.

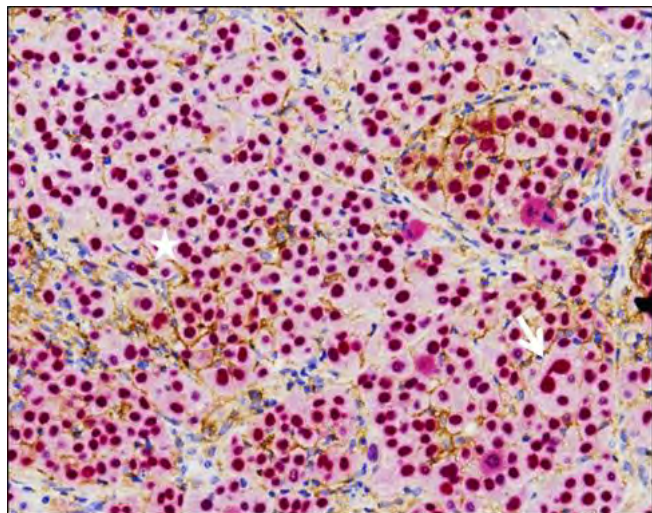
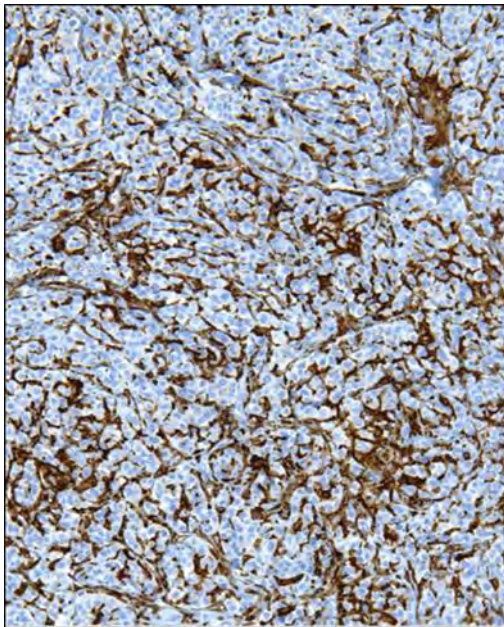
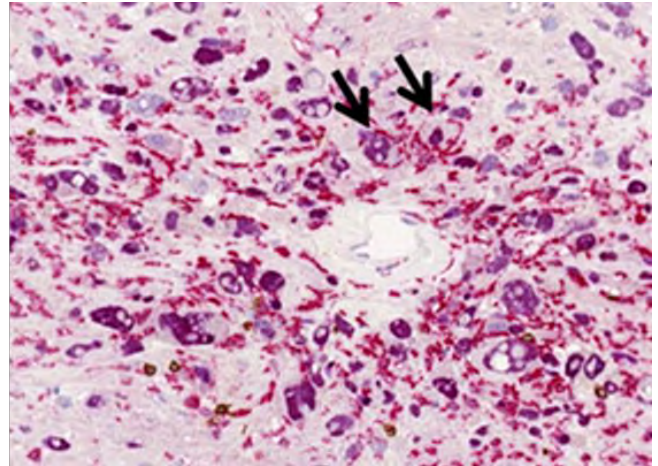
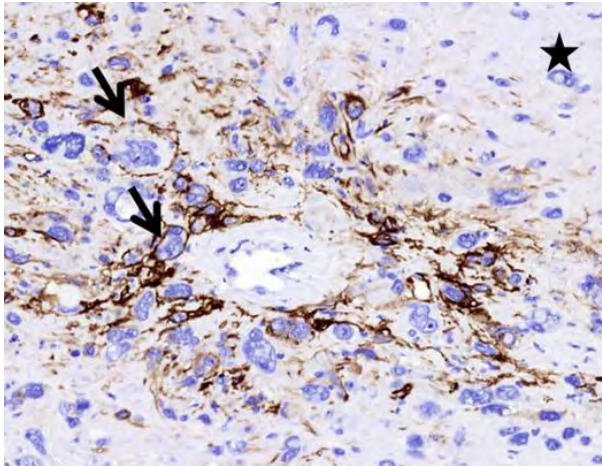


Figure 28. Macrophages PD-L1 positifs encerclant des cellules tumorales PD-L1 négatives, observées cette fois chez un patient présentant un mélanome muté NRAS, en réponse complète.

A. Immunomarquage PD-L1. Les cellules tumorales sont PD-L1 négatives (*), mais lorsqu'elles sont cernées par les dendrites des macrophages PD-L1+ (flèches), elles peuvent sembler positives avec marquage membranaire. **B.** Double marquage Sox10/PD-L1. Les cellules tumorales SOX10+ sont cernées par les dendrites des macrophages CD163+ (flèches) : si les macrophages sont PD-L1+ comme c'est le cas pour ce patient, il peut sembler que ce sont les cellules tumorales qui sont positives.



Ces images ont été observées dans un cas de réponse complète, un cas de maladie stable (tous deux mutés NRAS) et dans un cas non répondeur (non muté NRAS). Elles pourraient éventuellement évoquer des images de trogocytose, phénomène d'échanges membranaires intercellulaires.

IV. DISCUSSION

IV.A Performances prédictives du marqueur « PD-L1 tumoral » dans notre série

Nous avons observé dans notre série, un taux de réponse aux anti-PD-1 de 55.6% dans les mélanomes positifs pour PD-L1 tumoral, contre 41.7% dans les mélanomes négatifs pour PD-L1 tumoral. Dans la méta-analyse de Carbognin et coll. publiée en 2015¹⁸³, réalisée sur 1475 patients dont 636 mélanomes, issus de 7 essais cliniques de phases I à III, ces chiffres sont respectivement de 49.0% et 26.2%, le seuil de positivité du PD-L1 tumoral étant identique par ailleurs, fixé à au moins 5% de cellules tumorales positives. Les valeurs supérieures observées dans notre série sont biaisées, car nous avons sélectionné a posteriori, pour les besoins de nos travaux exploratoires, autant de patients répondeurs que de patients non répondeurs, ce qui ne reflète pas le taux de réponse habituellement observé aux anti-PD-1 d'environ 33%. La fréquence d'expression tumorale de PD-L1 est d'environ 40% dans les mélanomes (lorsque le seuil de positivité est fixé à 5% des cellules tumorales). Dans notre série, 10 patients sur 22 étaient positifs pour « PD-L1 tumoral ». Ce chiffre ne reflète cependant, là encore, pas la fréquence réelle de l'expression tumorale de PD-L1 puisque les patients ont été sélectionnés a posteriori.

Un échantillon unique par patient a été choisi pour l'analyse et la comparaison des performances prédictives des différents marqueurs. Cet échantillon correspond au dernier prélèvement effectué avant initiation du traitement anti-PD-1 (prélèvement jugé le plus représentatif de la maladie métastatique active car le plus récent dans l'histoire naturelle de chaque cas). En cas de blocs de multiples réalisés au sein du même prélèvement, c'est le bloc le plus positif pour PD-L1 qui a été choisi pour l'analyse. Cependant, l'échantillon à choisir (et même l'attitude consistant à choisir un échantillon unique par patient pour l'analyse) est encore sujet à débat, eu égard à la variabilité spatiale et temporelle de l'expression de PD-L1. Madore et coll. ¹⁵⁸ ont par exemple rapporté que le statut PD-L1 observé sur l'échantillon tumoral le plus récent est le plus concordant avec la réponse observée aux anti-PD-1 ; Taube et coll. ont à l'inverse observé que la documentation d'un échantillon PD-L1 positif chez un patient donné, qu'elle qu'en soit l'ancienneté, est corrélée avec une réponse aux anti-PD-1¹⁵⁶.

Nous avons retenu un seuil de positivité de 5% des cellules tumorales marquées pour PD-L1 tumoral. Ce seuil avait été antérieurement été retenu dans les essais cliniques pivots du Nivolumab et de la combinaison de celui-ci avec l'Ipilimumab.^{175,176,178} Ce choix est soumis à discussion, dans la mesure où le seuil retenu pour le développement du Pembrolizumab était de 1%¹⁷⁷. Cependant, nous n'avons pas observé dans les échantillons analysés, de taux de cellules tumorales PD-L1 positives compris entre 0 et 5%. Nous avons voulu voir si la prise en compte de l'intensité du marquage PD-L1, en tant que tel ou au sein d'un score immunohistochimique¹⁹⁶, permettait d'affiner la prédiction de réponse aux anti-PD-1. Nos résultats ne permettent pas de le confirmer. Bien que ceci puisse potentiellement être lié à un manque de puissance et au schéma de notre étude, aucun élément n'a à ce jour été rapporté dans ce sens.

Nous avons pris le soin de consigner tous les types de marquages PD-L1, y compris les éventuels marquages cytoplasmiques. Ceci a permis de mettre en évidence un cas de

réponse complète aux anti-PD-1, pour lequel l'expression du PD-L1 était exclusivement cytoplasmique. Cette observation soulève des questions de mécanismes concernant la physiologie du couple ligand-récepteur PD-L1/PD-1. Une fraction de PD-L1 soluble a été décrite dans les cancers bronchiques¹⁹⁷ et pourrait être impliquée dans la réponse thérapeutique observée chez ce patient. Nous ne pouvons pas exclure dans ce cas que l'efficacité du traitement anti-PD-1 ait reposé sur une expression membranaire variable dans le temps de PD-L1, pouvant être induite par l'activation lymphocytaire sous dépendance de la sécrétion paracrine d'interféron¹⁰².

Concernant la distribution des cellules tumorales PD-L1 positives, nous avons observé que leur localisation exclusive ou préférentielle en périphérie tumorale (équivalent métastatique du front d'invasion tumoral des lésions primitives) est significativement plus fréquente dans les cas répondeurs aux anti-PD-1. Ceci est concordant avec les données précédemment rapportées^{142,157} où ce profil d'expression est décrit comme étant caractéristique des profils de « résistance immunitaire adaptative » potentiellement réversibles par les anti-PD-1. Mais nous avons également observé dans notre série, 2 cas d'expression homogène de PD-L1 par 100% des cellules tumorales, correspondant respectivement à une réponse complète et une réponse dissociée (dans le cadre d'une maladie par ailleurs biconale NRAS/BRAF).

IV.B Algorithme de prédiction proposé

Nos données suggèrent que :

- le statut « PD-L1 tumoral » est associé à la réponse aux anti-PD-1, quel que soit le statut mutationnel NRAS,
- le statut « PD-L1 micro-environnemental » est associé à la non réponse aux anti-PD-1, en situation de mélanome non muté NRAS,
- le statut « PD-L1 micro-environnemental » est associé à la réponse aux anti-PD-1, en situation de mélanome muté NRAS.

Au total, nous proposons donc de remplacer le facteur prédictif simple « PD-L1 tumoral », par l'algorithme de prédiction suivant, prenant en compte le PD-L1 tumoral et les deux paramètres additionnels.

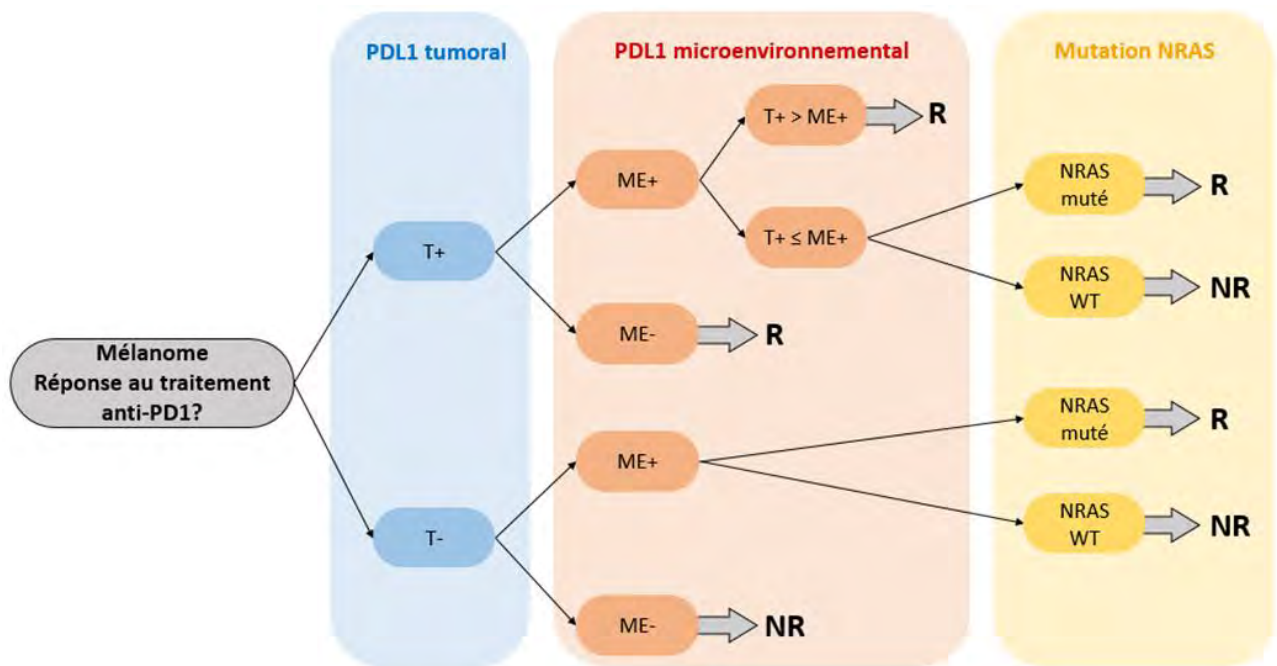


Figure 29. Algorithme de prédiction proposé.

T+ : cellules tumorales PD-L1 positives ; ME+ : cellules du micro-environnement PD-L1 positives ; R : prédiction de réponse ; NR : prédiction de non réponse ; NRAS WT : absence de mutation NRAS.

Cet algorithme peut se résumer ainsi :

- si positivité de PD-L1, exclusivement ou à prédominance, tumorale : prédiction de réponse ;
- si positivité de PD-L1, exclusivement ou à prédominance, micro-environnementale : prédiction de réponse si mutation NRAS, prédiction de non réponse si non muté NRAS ;
- si négativité de PD-L1, tumorale et micro-environnementale : prédiction de non réponse.

La non réponse associée à l'expression micro-environnementale préférentiellement macrophagique de PD-L1 pourrait être liée à une régulation cytokinique différente. En effet, l'expression tumorale de PD-L1 surviendrait plutôt suite à une activation immunitaire et une production de cytokines de type Th1 dont l'interféron gamma, alors que l'expression macrophagique de PD-L1 serait plutôt médiée par l'IL10, cytokine ambivalente à tendance immunosuppressive¹⁹⁸. Taube et coll. ont de plus décrit un nombre plus élevé de

checkpoints moléculaires coexprimés par les cellules PD-L1 positives du micro-environnement comparées aux cellules tumorales PD-L1 positives¹⁹⁸.

IV.C Dynamique spatiale et temporelle du profil d'expression bi-composante de PD-L1

Nous avons observé une grande variabilité inter- et intra-individuelle de l'expression tumorale et micro-environnementale de PD-L1, ceci avait déjà été rapporté par Madore et coll.¹⁵⁸ et Tumeh et coll.¹⁵⁷. Chez les non répondeurs en revanche (tous NRAS sauvages dans notre série), nous avons observé une étonnante constance du profil d'expression bi-composante de PD-L1 : caractérisé par une expression tumorale constamment négative ou inférieure à l'expression micro-environnementale (chez 9 patients non répondeurs sur les 11). Cette observation n'a à notre connaissance jamais été rapportée.

Cette observation suggère l'intérêt d'une évaluation itérative et répétée du statut PD-L1 chez un patient donné, afin d'en évaluer la cinétique d'expression tumorale de PD-L1 qui, si elle est nulle, avec un « PD-L1 tumoral » constamment nul ou inférieur au « PD-L1 micro-environnemental » n'inciterait pas à prescrire un anti-PD-1 en monothérapie.

IV.D NRAS et immunothérapie

Nous avons pu observer, dans un cas de maladie biclonale mise en évidence à l'occasion d'une réponse dissociée à un traitement anti-BRAF (avec un clone muté BRAF et un clone muté NRAS), une levée de la réponse dissociée lors l'immunothérapie par Ipilimumab (entraînant une réponse partielle homogène) et une réapparition de la réponse dissociée lors de l'immunothérapie consécutive par anti-PD-1. Ceci suggère un effet différent de ces deux types d'immunothérapies sur les mélanomes porteurs des mutations oncogéniques NRAS et BRAF, et renforce l'hypothèse du lien particulier entre immunothérapie par anti-PD-1 et mutation oncogénique. Nous émettons l'hypothèse d'un immunogénicité plus importante des néo-antigènes NRAS en comparaison avec les néo-antigènes BRAF, mais notre étude ne permet pas d'explorer cette piste. Les études pivots évaluant le Nivolumab et le Pembrolizumab n'apportent malheureusement pas plus d'éléments de réponse, car il n'y a pas eu de stratification en fonction du statut mutationnel NRAS. Nous pouvons seulement dire que la stratification selon le statut mutationnel BRAF n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative de réponse entre les sous-groupes BRAF muté et non muté.

Nous avons de plus observé dans un autre cas, un phénomène possible de sélection clonale lors de l'échappement à l'immunothérapie par anti-PD-1, au cours duquel est apparu un clone ayant perdu une mutation NRAS initialement présente. Ceci suggère que la perte de la mutation NRAS pourrait favoriser l'échappement de la tumeur à l'anti-PD-1. Une fois de plus notre étude ne permettait pas d'évaluer cette hypothèse. Une sensibilité accrue aux immunothérapies des mélanomes métastatiques mutés NRAS a déjà été décrite. Joseph et coll. ont ainsi rapporté en 2012 un taux de réponse à l'IL2 de 47% chez les patients mutés NRAS contre seulement 12% en l'absence de mutation NRAS¹⁹⁹. De meilleurs taux de réponse à l'immunothérapie au sens large ont également été rapportés par Johnson et coll., dans une étude rétrospective de 229 patients où la réponse à l'immunothérapie était analysée en fonction du génotype²⁰⁰. Les trois principales immunothérapies des lignes métastatiques étaient étudiées, à savoir : l'IL2, l'Ipilimumab, et les anti-PD-1 ou anti-PD-L1. Le gain lié à la mutation NRAS était particulièrement marqué dans la cohorte anti-PD-1/anti-PD-L1, avec un accroissement du taux de réponses estimé à 73% en cas de mutation NRAS contre seulement 35% en l'absence de mutation NRAS. Dans cette analyse rétrospective, le gain lié à la mutation NRAS lors d'un traitement par Ipilimumab était moindre mais présent (42% versus 18% de bénéfice clinique en présence d'une mutation NRAS versus en l'absence de mutation NRAS) et il n'était pas retrouvé lors d'un traitement par IL2²⁰⁰.

IV.E NRAS et macrophages

A notre connaissance, la nature mécanistique du lien suspecté entre mélanomes mutés NRAS et sensibilité aux immunothérapies en particulier de type anti-PD-1, n'a cependant pas été élucidée ; nous suggérons qu'il puisse se trouver dans le micro-environnement PD-L1 positif, qui est essentiellement composé de macrophages.

De façon troublante dans le cas de maladie biconale décrit ci-dessus, nous avons observé dans le même ganglion métastatique, deux profils très différents d'infiltrats macrophagiques.

Un technique bioinformatique multimodale complexe d'immunoprofiling récemment publiée²⁰¹, intégrant des données de transcriptomique, de protéomique visant à caractériser les interactions protéiques et des données immunohistochimiques d'infiltrats immunologiques, rapporte que dans les mélanomes mutés NRAS, les lymphocytes T cytotoxiques ont des interactions significativement plus importantes avec les macrophages (et d'autres cellules de la lignée myéloïde telles que les cellules dendritiques et les mastocytes), comparés aux mélanomes mutés BRAF (figure 30).

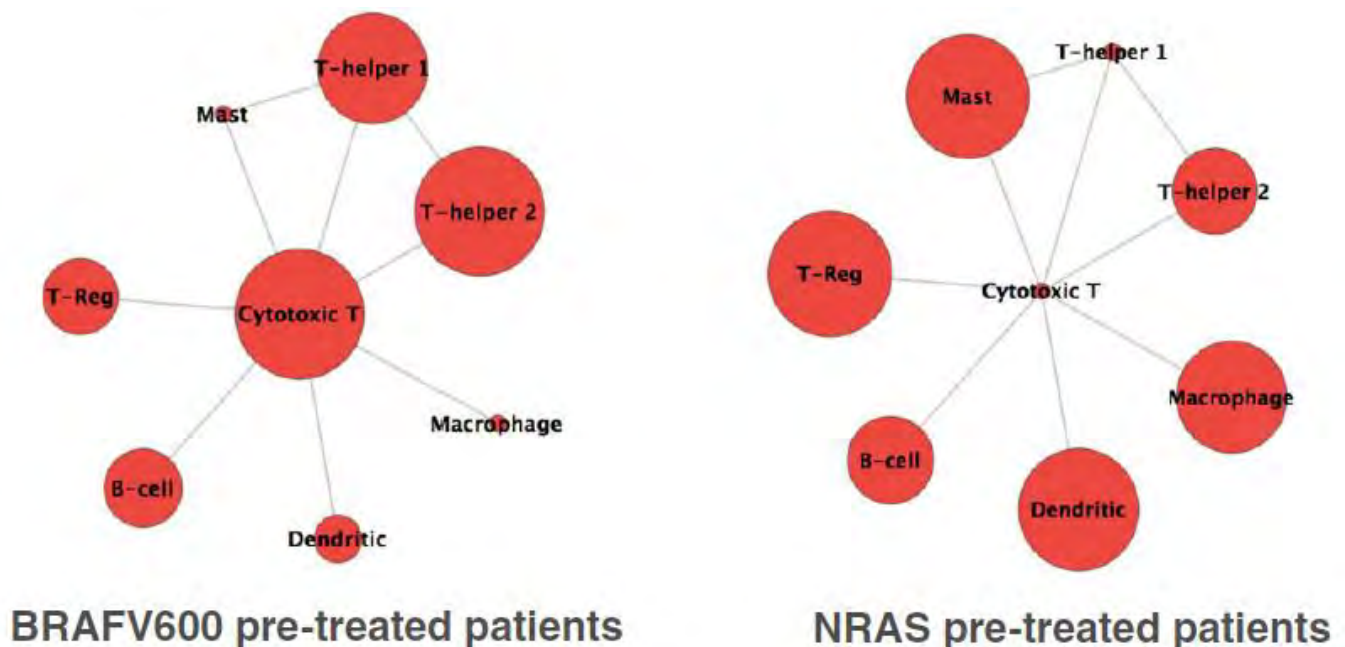


Figure 30. Réseau d'interaction des lymphocytes T cytotoxiques infiltrant les mélanomes avec les autres cellules immunitaires en fonction du statut mutationnel tumoral.
Clancy et coll. BMC Bioinformatics 2016²⁰¹

Nos résultats sont concordants avec cette publication et pourraient expliquer, au moins en partie la valeur prédictive de réponse thérapeutique du micro-environnement PD-L1 positif que nous avons observée en cas de mutation NRAS.

V. CONCLUSION

Nous rapportons une faible valeur prédictive de la réponse thérapeutique aux anti-PD-1 du marquage PD-L1 lorsqu'il est évalué exclusivement sur les cellules tumorales, y compris en tenant compte du type d'expression (membranaire versus cytoplasmique) et de l'intensité de l'expression.

Nos résultats montrent en contrepartie que l'analyse du patron d'expression de PD-L1 (péritumorale versus globale), et que la prise en compte des composantes cellulaires exprimant PD-L1, combinée au statut mutationnel NRAS, semble améliorer la valeur prédictive du marquage PD-L1 sur la réponse thérapeutique à une monothérapie par anti-PD-1.

Bien que notre étude ait été conduite de manière rétrospective sur une courte série, nos résultats suggèrent qu'il serait peut-être important d'analyser l'expression multi-composante du PD-L1 sur plusieurs prélèvements de manière à mieux définir les patients susceptibles de recevoir le traitement.

Nous proposons un algorithme de prédiction prenant en compte ces différents paramètres, qui semble améliorer les performances prédictives du « PD-L1 tumoral » seul.

Sous réserve d'une validation ultérieure, l'algorithme proposé présente l'intérêt d'être facilement applicable en routine clinique, ne requérant que l'immunomarquage PD-L1 et la prise en compte du statut mutationnel NRAS qui est déjà réalisé en pratique courante.

L'application de cet algorithme nécessite toutefois de distinguer macrophages PD-L1 positifs et cellules tumorales PD-L1 positives, ces deux populations cellulaires PD-L1 positives n'ayant pas les mêmes significations prédictives et étant parfois difficiles à distinguer.

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
De Médecine Rangueil
9.9.2016
F. SERRANO

Pr. Jean Pierre DELORD
Coordonnateur DES Oncologie Médicale
INSTITUT CLAUDIUS REGAUD
1 avenue Irène Joliot-Curie
IUCT-O
31059 TOULOUSE CEDEX 9
RPPS 10002903382 - Finess 31 078 2347
Tél. 05 31 15 51 01 • Fax 05 31 15 57 87

Don pour accord

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1171–1174 (1967).
2. McGovern VJ. Spontaneous regression of melanoma. *Pathology (Phila.)* 7, 91–99 (1975).
3. Barr RJ. The many faces of completely regressed malignant melanoma. *Pathol. Phila. Pa* 2, 359–370 (1994).
4. Džambová M and al. Malignant melanoma in organ transplant recipients: incidence, outcomes, and management strategies: a review of literature. *Dermatol. Ther.* 29, 64–68 (2016).
5. Penn I. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 61, 274–278 (1996).
6. Gogas H and al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N. Engl. J. Med.* 354, 709–718 (2006).
7. Byrne KT and al. New perspectives on the role of vitiligo in immune responses to melanoma. *Oncotarget* 2, 684–694 (2011).
8. Nordlund JJ and al. Vitiligo in patients with metastatic melanoma: a good prognostic sign. *J. Am. Acad. Dermatol.* 9, 689–696 (1983).
9. Bystryń JC and al. Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch. Dermatol.* 123, 1053–1055 (1987).
10. Lee PP and al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* 5, 677–685 (1999).
11. Clemente CG and al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303–1310 (1996).
12. Shankaran V and al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111 (2001).
13. Schreiber RD and al. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570 (2011).
14. Dunn GP and al. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148 (2004).
15. Girardi M et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605–609 (2001).
16. Smyth MJ and al. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2, 293–299 (2001).
17. Koebel CM and al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907 (2007).

18. Jäger E and al. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int. J. Cancer* 66, 470–476 (1996).
19. Wrzesinski SH and al. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 5262–5270 (2007).
20. Katz JB and al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol. Rev.* 222, 206–221 (2008).
21. Terabe M and al. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 157–162 (2004).
22. Gabrilovich DI and al. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174 (2009).
23. Dong, H and al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793–800 (2002).
24. Fridman WH and al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298-306 (2012).
25. Mlecnik B and al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 20;29(6):610-8.
26. Broussard EK and al. TNM staging in colorectal cancer: T is for T cell and M is for memory. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 20;29(6):601-3.
27. Wherry EJ and al. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug;15(8):486-99.
28. Lee N and al. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology.* 2016 Feb;48(2):177-87.
29. Clark WH and al. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Research* Volume 29, Issue 3, 1 March 1969, Pages 705-727
30. Clemente CG and al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996;77:1303-10.
31. Yang F and al. Adoptive Cellular Therapy (ACT) for Cancer Treatment. *Adv Exp Med Biol.* 2016;909:169-239.
32. Verdegaal EM. Adoptive cell therapy: a highly successful individualized therapy for melanoma with great potential for other malignancies. *Curr Opin Immunol.* 2016 Apr;39:90-5.
33. Wang X and al. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics.* 2016 Jun 15;3:16015.
34. Melief CJ and al. Lessons from T cell responses to virus induced tumours for cancer eradication in general. *Cancer Surv.* 1992;13:81-99.

35. Villadangos JA. Antigen-specific impairment of adoptive T-cell therapy against cancer: players, mechanisms, solutions and a hypothesis. *Immunol Rev.* 2016 Jul;272(1):169-82.
36. Seledtsov VI and al. Clinically feasible approaches to potentiating cancer cell-based immunotherapies. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(4):851-69.
37. Nakano O and al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001 Jul 1;61(13):5132-6.
38. Haanen JB and al. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Apr;55(4):451-8.
39. Zippelius A and al. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res.* 2004 Apr 15;64(8):2865-73.
40. Ahmadzadeh M and al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009 Aug 20;114(8):1537-44.
41. Baitsch L and al. Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6):2350-60.
42. Barber DL and al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):682-7.
43. Antony PA and al. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2591-601.
44. Perez-Diez A and al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5346-54.
45. Quezada SA and al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med.* 2010 Mar 15;207(3):637-50.
46. Muranski P and al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood.* 2008 Jul 15;112(2):362-73.
47. Bluestone JA, and al. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):253-7.
48. Ahmadzadeh M and al. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood* 2008 112:4953-4960
49. Viguiier M and 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.* 2004 Jul 15;173(2):1444-53.
50. Ahmadzadeh M and al. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25^(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood.* 2006 Mar 15;107(6):2409-14.

51. Van Elsas A and al. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med*. 1999 Aug 2;190(3):355-66.
52. Suttmüller RP and al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):823-32.
53. Spits H and al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):145-9.
54. Fregni G and al. Phenotypic and functional characteristics of blood natural killer cells from melanoma patients at different clinical stages. *PLoS One*. 2013 Oct 18;8(10):e76928.
55. Hersey P and al. Relationship between natural killer cell activity and histological features of lymphocyte infiltration and partial regression of the primary tumor in melanoma patients. *Cancer Res* 1982.
56. Campbell KS and al. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep;132(3):536-44.
57. Kohlhapp FJ and al. NK cells and CD8+ T cells cooperate to improve therapeutic responses in melanoma treated with interleukin-2 (IL-2) and CTLA-4 blockade. *J Immunother Cancer*. 2015 May 19;3:18.
58. Kärre K and al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. 1986. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):6566-9.
59. Platonova S and al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res*. 2011 Aug 15;71(16):5412-22.
60. Mirjačić Martinović KM and al. Decreased expression of NKG2D, NKp46, DNAM-1 receptors, and intracellular perforin and STAT-1 effector molecules in NK cells and their dim and bright subsets in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res*. 2014 Aug;24(4):295-304.
61. Markel G and al. Natural killer lysis receptor (NKLR)/NKLR-ligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells. *PLoS One*. 2009;4(5):e5597.
62. Ladányi A and al. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Dec;60(12):1729-38.
63. Martínez-Escribano JA and al. Changes in the number of CD80(+), CD86(+), and CD28(+) peripheral blood lymphocytes have prognostic value in melanoma patients. *Hum Immunol*. 2003 Aug;64(8):796-801.
64. Carpenter EL and al. Collapse of the CD27+ B-cell compartment associated with systemic plasmacytosis in patients with advanced melanoma and other cancers. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1;15(13):4277-87.

65. Staquicini FI and al. A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Res.* 2008 Oct 15;68(20):8419-28.
66. Vogel LA and al. Inhibition of murine B1 lymphocytes by interleukin-12. *Eur J Immunol.* 1996 Jan;26(1):219-23.
67. Tagliabue A and al. Natural cytotoxicity of mouse monocytes and macrophages. *J Immunol.* 1979 Jun;122(6):2363-70.
68. Martinez FO and al. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014 Mar 3;6:13.
69. Komohara Y and al. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci.* 2014 Jan;105(1):1-8.
70. Rowe CJ and al. Molecular markers to complement sentinel node status in predicting survival in patients with high risk locally invasive melanoma. *Int J Cancer* 2016 Mar 14.
71. Bronkhorst IH and al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Feb 3;52(2):643-50.
72. Jensen TO and al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 10;27(20):3330-7.
73. Messaoudene M and al. Characterization of the Microenvironment in Positive and Negative Sentinel Lymph Nodes from Melanoma Patients. *PLoS One.* 2015 Jul 28;10(7):e0133363.
74. Mansfield AS and al. Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis. *Mod Pathol.* 2011 Apr;24(4):487-94.
75. Saito Y and al. Prognostic Significance of CD169+ Lymph Node Sinus Macrophages in Patients with Malignant Melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2015 Dec;3(12):1356-63.
76. Mantovani A and al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002 Nov;23(11):549-55.
77. Bingle L and al. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002 Mar;196(3):254-65.
78. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jan;4(1):71-8.
79. Baay M and al. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:565187.
80. Solinas G and al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009 Nov;86(5):1065-73.
81. Hasita H and al. An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1 ligands (PD-L1/2) on infiltrating macrophages in lymphoma. *Cancer Sci.* 2016 Aug 26.

82. Said EA and al. Increased CD86 but Not CD80 and PD-L1 Expression on Liver CD68+ Cells during Chronic HBV Infection. *PLoS One*. 2016 Jun 27;11(6):e0158265.
83. Kim JH and al. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2016 Aug 9;115(4):490-6.
84. Clawson GA and al. Macrophage-tumor cell fusions from peripheral blood of melanoma patients. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0134320.
85. Mills CD and al. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*. 2016 Feb 1;76(3):513-6.
86. Piaggio F and al. A novel liposomal Clodronate depletes tumor-associated macrophages in primary and metastatic melanoma: Anti-angiogenic and anti-tumor effects. *J Control Release*. 2016 Feb 10;223:165-77.
87. Sluijter M and al. Inhibition of CSF-1R supports T-cell mediated melanoma therapy. *PLoS One*. 2014 Aug 11;9(8):e104230.
88. Ries CH and al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell*. 2014 Jun 16;25(6):846-59.
89. Weber J and al. Phase I/II Study of Metastatic Melanoma Patients Treated with Nivolumab Who Had Progressed after Ipilimumab. *Cancer Immunol Res*. 2016 Apr;4(4):345-53.
90. Melief CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):372-83.
91. Gerlini G and al. Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin Immunol*. 2007 Nov;125(2):184-93.
92. Abbas AK and al. *Cellular and Molecular Immunology*, Abbas, 8th Edition.
93. Hara T and al. Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J. Exp. Med*. 161, 1513–1524 (1985).
94. Martin PJ and al. A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 136, 3282–3287 (1986).
95. Damle NK and al. Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 140, 1753–1761 (1988).
96. Lindstein T and al. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 244, 339–343 (1989).
97. Ledbetter JA and al. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood* 75, 1531–1539 (1990).

98. Van Lier RA and al. T cell receptor/CD3 and CD28 use distinct intracellular signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* 21, 1775–1778 (1991).
99. June CH and al. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* 11, 211–216 (1990).
100. Jenkins MK and al. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 147, 2461–2466 (1991).
101. Linsley PS and al. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 191–212 (1993).
102. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar 22;12(4):252-64.
103. Robert L and al. CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res.* 2014 May 1;20(9):2424-32.
104. Brunet JF and al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328, 267–270 (1987).
105. Lafage-Pochitaloff M and al. Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33–q34. *Immunogenetics* 31, 198–201 (1990).
106. Tivol EA and al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541–547 (1995).
107. Waterhouse P and al. Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctl4-4. *Science* 270, 985–988 (1995).
108. Read S and al. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):295-302.
109. van der Merwe PA and al. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* 185, 393–403 (1997).
110. Collins AV and al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201–210 (2002).
111. Bretscher, P. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunol. Today* 13, 74–76 (1992).
112. Walker LSK and al. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 852–863 (2011).
113. Dong H and al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999 Dec;5(12):1365-9.
114. Nishimura H and al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999 Aug;11(2):141-51.

115. Nishimura H and al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001 Jan 12;291(5502):319-22.
116. Yao S and al. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Feb;12(2):130-46.
117. Robert L and al. Distinct immunological mechanisms of CTLA-4 and PD-1 blockade revealed by analyzing TCR usage in blood lymphocytes. *Oncoimmunology*. 2014 Jun 25;3:e29244.
118. Buchbinder EI and al. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98-106.
119. Keir ME and al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
120. Sharpe AH and al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007 Mar;8(3):239-45.
121. Freeman GJ and al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1027-34.
122. Agata Y and al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):765-72.
123. Sinclair NR. Why so many coinhibitory receptors? *Scand J Immunol*. 1999 Jul;50(1):10-3.
124. Youngnak P and al. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug 1;307(3):672-7.
125. Topalian SL and al. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012 Apr;24(2):207-12.
126. Wilke CM and al. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Nov;60(11):1529-41.
127. Shin T and al. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2005 May 16;201(10):1531-41.
128. Riella LV and al. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant*. 2012 Oct;12(10):2575-87.
129. Francisco LM and al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3015-29.
130. Sheppard KA and al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett*. 2004 Sep 10;574(1-3):37-41.
131. Chemnitz JM and al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):945-54.
132. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):114-25.

133. Wang J and al. Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 16;102(33):11823-8.
134. Galatica Z and al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014 ;23 :2965-2970.
135. Dong H and al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 8, 793 - 800 (2002).
136. Siska PJ and al. T cell metabolic fitness in antitumor immunity. *Trends Immunol*, Volume 36, Issue 4, p257–264, April 2015.
137. Chang CH and al. Metabolic competition in the tumor microenvironment determines cancer progression. *J Immunol* May 1, 2015 vol.194 (1 Supplement) 142.5
138. Kleffel S and al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell* Volume 162, Issue 6, p1242–1256, 10 September 2015.
139. Curiel TJ and al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*. 2003 May;9(5):562-7.
140. Kuang DM and al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*. 2009 Jun 8;206(6):1327-37.
141. Liu Y and al. B7-H1 on myeloid-derived suppressor cells in immune suppression by a mouse model of ovarian cancer. *Clin Immunol*. 2008 Dec;129(3):471-81.
142. Taube JM and al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012 Mar 28;4(127):127ra37.
143. Parsa AT and al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*. 2007 Jan;13(1):84-8. Epub 2006 Dec 10.
144. Marzec M and al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20852-7.
145. Koh J and al. EML4-ALK enhances programmed cell death-ligand 1 expression in pulmonary adenocarcinoma via hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and STAT3. *Oncoimmunology*. 2015 Oct 29;5(3):e1108514. eCollection 2016 Mar.
146. Yamamoto R and al. B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci*. 2009 Nov;100(11):2093-100. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01302.x. Epub 2009 Aug 1.
147. Atefi M and al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2014 Jul 1;20(13):3446-57.
148. Massi D and al. The status of PD-L1 and tumor-infiltrating immune cells predict resistance and poor prognosis in BRAFi-treated melanoma patients harboring mutant BRAFV600. *Ann Oncol*. 2015 Sep;26(9):1980-7.

149. Kakavand H and al. PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes Define Different Subsets of MAPK Inhibitor-Treated Melanoma Patients. *Clin Cancer Res.* 2015 Jul 15;21(14):3140-8.
150. Jiang X and al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013 Feb 1;19(3):598-609.
151. Rodić N and al. PD-L1 expression in melanocytic lesions does not correlate with the BRAF V600E mutation. *Cancer Immunol Res.* 2015 Feb;3(2):110-5.
152. Teng MW and al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015 Jun 1;75(11):2139-45.
153. Massi D and al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Ann Oncol.* 2014 Dec;25(12):2433-42.
154. Kluger HM and al. Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites. *Clin Cancer Res.* 2015 Jul 1;21(13):3052-60.
155. Kakavand H and al. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Mod Pathol.* 2015 Dec;28(12):1535-44.
156. Taube JM and al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 2014 Oct 1;20(19):5064-74.
157. Tumeh PC and al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014 Nov 27;515(7528):568-71.
158. Madore J and al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 May;28(3):245-53.
159. Berghoff and al. Tumour-infiltrating lymphocytes and expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in melanoma brain metastases. *Histopathology.* 2015 66(2), 289-299.
160. Krönig H and al. PD-1 expression on Melan-A-reactive T cells increases during progression to metastatic disease. *Int J Cancer.* 2012 May 15;130(10):2327-36.
161. Chapon M and al. Progressive upregulation of PD-1 in primary and metastatic melanomas associated with blunted TCR signaling in infiltrating T lymphocytes. *J Invest Dermatol.* 2011 Jun;131(6):1300-7.
162. Blackburn SD and al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2009 Jan;10(1):29-37.
163. Shin DS and al. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr Opin Immunol.* 2015 Apr;33:23-35.
164. Melero I and al. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015 Aug;15(8):457-72.

165. Fuertes Marraco SA and al. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol.* 2015 Jun 26;6:310.
166. Topalian SL and al. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016 May;16(5):275-87.
167. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop.* 3–11 (1991).
168. Allison JP. Checkpoints. *Cell.* 2015 Sep 10;162(6):1202-5.
169. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science.* 2013 Dec 20;342(6165):1432-3.
170. Brahmer JR and al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 1;28(19):3167-75.
171. Topalian SL and al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2443-54.
172. Hodi FS et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723 (2010).
173. Robert C et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 2517–2526 (2011).
174. European Medicines Agency - Find medicine - Yervoy. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002213/human_med_001465.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. (Accessed: 18th July 2016)
175. Robert C and al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015 Jan 22;372(4):320-30.
176. Weber JS and al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015 Apr;16(4):375-84.
177. Robert C and al. Pembrolizumab versus Ipilimumab Keynote 006. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2015 Jun 25;372(26):2521-32.
178. Weber JS and al. Sequential administration of nivolumab and ipilimumab with a planned switch in patients with advanced melanoma (CheckMate 064): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jul;17(7):943-55.
179. Larkin J and al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015 Jul 2;373(1):23-34.
180. Wolchok D and al. Updated results from a phase III trial of nivolumab (NIVO) combined with ipilimumab (IPI) in treatment-naïve patients (pts) with advanced melanoma (MEL) (CheckMate 067). *J Clin Oncol.* 2016;34 (suppl; abstr 9505).
181. Postel-Vinay S and al. Challenges of phase 1 clinical trials evaluating immune checkpoint-targeted antibodies. *Ann Oncol.* 2016 Feb;27(2):214-24.

182. Hua C and al. Association of Vitiligo With Tumor Response in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Pembrolizumab. *JAMA Dermatol.* 2016 Jan;152(1):45-51.
183. Carbognin L and al. Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers. *PLoS One.* 2015 Jun 18;10(6):e0130142.
184. Sunshine J and al. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2015 Aug;23:32-8.
185. Mahoney KM and al. PD-L1 Antibodies to Its Cytoplasmic Domain Most Clearly Delineate Cell Membranes in Immunohistochemical Staining of Tumor Cells. *Cancer Immunol Res.* 2015 Dec;3(12):1308-15.
186. Mahoney KM and al. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. *Oncology (Williston Park).* 2014 Nov;28 Suppl 3:39-48.
187. Herbst RS and al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014 Nov 27;515(7528):563-7.
188. Powles T and al. MPDL3280a (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature.* 2014 Nov 27;515(7528):558–62.
189. Meng X and al. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2015 Dec;41(10):868-76.
190. Teng MW and al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015 Jun 1;75(11):2139-45.
191. Ribas A and al. PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol Res.* 2016 Mar;4(3):194-203.
192. Lawrence MS and al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013 Jul 11;499(7457):214-8.
193. Madore J and al. PD-L1 Negative Status is Associated with Lower Mutation Burden, Differential Expression of Immune-Related Genes, and Worse Survival in Stage III Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2016 Aug 1;22(15):3915-23.
194. Antoni Ribas and al. Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *Journal of Clinical Oncology*, 2015 ASCO Annual Meeting (May 29 - June 2, 2015). Vol 33, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2015: 3001.
195. Lipson EJ and al. Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. *J Immunother Cancer.* 2014 Dec 16;2(1):42.
196. Dolled-Filhart M and al. Development of a Companion Diagnostic for Pembrolizumab in Non-Small Cell Lung Cancer Using Immunohistochemistry for Programmed Death Ligand-1. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Aug 23.

197. Sorensen SF and al. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer*. 2016 Oct;100:77-84.
198. Taube JM and al. Differential expression of immune-regulatory genes associated with PD-L1 display in melanoma : implications for PD-1 pathway blockade. *Clin Cancer Res* 2015;21:3969-3976.
199. Joseph RW and al. Correlation of NRAS mutations with clinical response to high-dose IL-2 in patients with advanced melanoma. *J Immunother*. 2012 Jan;35(1):66-72.
200. Johnson DB and al. Impact of NRAS mutations for patients with advanced melanoma treated with immune therapies. *Cancer Immunol Res*. 2015 Mar;3(3):288-95.
201. Clancy T and al. Profiling networks of distinct immune-cells in tumors. *BMC Bioinformatics*. 2016 Jul 4;17(1):263.

Etude pilote de l'évaluation multi-composante de l'expression tumorale et micro-environnementale de PD-L1 en tant que facteur prédictif de réponse dans les mélanomes traités par inhibiteurs de PD-1.

RESUME :

La valeur prédictive insuffisante de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ne permet actuellement pas d'utiliser ce marqueur comme facteur prédictif de réponse aux anti-PD-1 dans la prise en charge courante des mélanomes métastatiques. Nous avons mené de façon rétrospective sur 21 patients, une étude pilote d'évaluation multi-composante de l'expression de PD-L1. Nos résultats suggèrent que l'analyse du patron d'expression de PD-L1 (péritumorale versus globale), et que la prise en compte des composantes cellulaires exprimant PD-L1, combinée au statut mutationnel NRAS, semblent améliorer la valeur prédictive du marquage PD-L1 sur la réponse thérapeutique à une monothérapie par anti-PD-1. Nos résultats suggèrent de plus qu'il serait peut-être important d'analyser l'expression multi-composante de PD-L1 sur plusieurs prélèvements de manière à mieux définir les patients susceptibles de recevoir le traitement. Nous proposons un algorithme de prédiction prenant en compte ces différents paramètres, qui semble améliorer les performances prédictives du « PD-L1 tumoral » seul. L'algorithme proposé présente l'avantage d'être facilement réalisable, ne nécessitant qu'un immunomarquage PD-L1 et la détermination du statut mutationnel NRAS.

Multicomponent evaluation of tumor cell and microenvironment expression of PD-L1 as a predictive factor for response to PD-1 inhibitors in melanoma: A pilot study.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée en oncologie

MOTS-CLÉS : mélanome ; inhibiteurs de PD-1 ; facteurs prédictifs de réponse ; profil d'expression de PD-L1 ; cellules tumorales ; micro-environnement tumoral.

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directeur de thèse : Pr Nicolas MEYER