



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE
présenté
par

RAMELET Maxime

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DANS 3
MODELES IN VIVO DE CANCERS TRAITÉS PAR DES INHIBITEURS
DE CHECKPOINTS IMMUNITAIRES

Soutenu le 05 décembre 2017 devant le jury suivant :

Dr. Françoise TROUSSE – Présidente
Dr. Marc HILLAIRET DE BOISFERON – Tuteur scientifique
Dr. Catherine PAUL – Tutrice pédagogique
Dr. Céline MIRJOLET – Rapporteuse
Dr. Florence MEYER-LOSIC – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :
Dr. Marc Hillairet de Boisferon
Oncodesign - 20 rue Jean Mazen, 21000 Dijon
Président Directeur Général : Dr. Philippe Genne

Et de

Dr. Catherine Paul
Laboratoire Immunologie et Immunothérapie des Cancers
EA7269 uB/EPHE - Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon
Directeur : Dr Ali Bettaieb



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE
présenté
par

RAMELET Maxime

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DANS 3
MODELES IN VIVO DE CANCERS TRAITÉS PAR DES INHIBITEURS
DE CHECKPOINTS IMMUNITAIRES

Soutenu le 05 décembre 2017 devant le jury suivant :

Dr. Françoise TROUSSE – Présidente
Dr. Marc HILLAIRET DE BOISFERON – Tuteur scientifique
Dr. Catherine PAUL – Tutrice pédagogique
Dr. Céline MIRJOLET – Rapporteuse
Dr. Florence MEYER-LOSIC – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :
Dr. Marc Hillairet de Boisferon
Oncodesign - 20 rue Jean Mazen, 21000 Dijon
Président Directeur Général : Dr. Philippe Genne

Et de

Dr. Catherine Paul
Laboratoire Immunologie et Immunothérapie des Cancers
EA7269 uB/EPHE - Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon
Directeur : Dr Ali Bettaieb

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier Philippe Genne, PDG de la société Oncodesign qui a accepté que je prépare ma formation au sein de cet établissement et de profiter des ressources disponibles pour effectuer mes travaux.

J'adresse aussi mes remerciements au Fongecif Bourgogne pour avoir accepté de financer la majeure partie de ma formation, non sans difficultés... Merci Frédérique et Audrey pour m'avoir aidé au montage des dossiers.

Je remercie particulièrement Marc Hillairet de Boisferon pour avoir accepté de m'épauler dans ce travail au sein d'Onco, pour son aide, son expérience et pour le temps qu'il m'a accordé pour mettre en place des manips.

Remerciements adressés également à Catherine Paul de l'EPHE pour sa confiance, son aide et ses conseils tout au long de ces quelques années.

Un très grand merci à Jean-François pour son aide précieuse, ses discussions enrichissantes et pour l'intérêt qu'il a porté à ce projet.

Je remercie particulièrement Charlotte, Nathalie, Damien, Loïc et Xavier pour leur aide dans l'élaboration des posters, leurs conseils et pour avoir secoué les données dans tous les sens et en sortir de beaux heatmaps qu'on a parfois du mal à comprendre au premier coup d'œil.

Merci à toute la BCE et notamment Cécile pour les luminex et Valérie pour les infos FACS, au CRBC et aux animaliers pour leur participation dans ce projet.

Je tiens à remercier aussi Zina, pour son soutien, et sans qui certaines manips n'auraient peut-être pas vu le jour.

Bien évidemment, un énorme merci à tous mes collègues du vivo pour cette ambiance, ces gâteaux, ces rigolades et tout de même un peu aussi pour le travail accompli, souvent à la dernière minute... Oui, je vous ferai un gâteau pour tout ça.

Pour finir, merci à toi, pour ton soutien, ton aide, tes conseils pendant ma formation. M'épauler au quotidien n'aura pas été une mince affaire...

Table des matières

Liste des tableaux.....	4
Liste des figures.....	5
Liste des abréviations.....	8
1. Introduction	13
1.1. Présentation de l'entreprise	13
1.2. Cancer et système immunitaire.....	14
1.2.1. Généralités à propos du cancer.....	14
1.2.2. L'immunosurveillance et l'immunoédition.....	16
1.2.3. Les acteurs cellulaires et moléculaires de la réponse au développement tumoral.....	20
1.3. Les checkpoints immunitaires	23
1.4. Immunothérapie.....	25
1.4.1. Historique	25
1.4.2. CTLA-4 et PD1	27
1.4.3. Toxicité.....	32
1.4.4. Combinaisons	33
1.5. Objectifs.....	35
2. Matériels et méthodes.....	37
2.1. Lignées cellulaires tumorales et conditions de culture.....	37
2.1.1. Lignées cellulaires tumorales	37
2.1.2. Conditions de culture.....	37
2.2. Emploi d'animaux	38
2.2.1. Animaux	38
2.2.2. Conditions d'hébergement.....	39
2.2.3. Monitoring.....	40
2.2.4. Points limites	40
2.2.5. Procédures	41

2.3.	Produits de traitement	41
2.4.	Design expérimental et traitements	42
2.4.1.	Inductions tumorales	42
2.4.2.	Schéma de traitement	43
2.4.3.	Prélèvements.....	44
3.	Résultats et discussion.....	51
3.1.	Evaluation de l'efficacité anti-tumorale d'anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD1.	51
3.1.1.	Activité anti-tumorale <i>in vivo</i>	51
3.1.2.	Incidence des traitements sur les métastases 4T1.....	55
3.1.3.	Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire.....	56
3.1.4.	Létalité.....	61
3.2.	Evaluation de l'activité anti-tumorale d'inhibiteurs de checkpoints immunitaires seuls ou en combinaison sur le modèle 4T1	62
3.2.1.	Design expérimental.....	62
3.2.2.	Réduction de la mortalité.....	66
3.2.3.	Efficacité des monothérapies et combinaisons d'ICI dans le modèle 4T1	68
3.3.	Comparaison des effets de la combinaison anti-4-1BB/anti-PD1 dans 2 modèles de tumeur mammaire murine : 4T1 <i>versus</i> EMT-6.....	83
3.3.1.	Efficacité anti-tumorale	84
3.3.2.	Profils cytokiniques	86
4.	Conclusions et perspectives	91
4.1.	La réponse est individu-dépendante	91
4.2.	Analyses complémentaires	92
4.3.	Développement de combinaisons	93
4.4.	Caractérisation des modèles précliniques en réponse aux traitements d'ICI .	94

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques essais cliniques ciblant les checkpoints immunitaires en 2014 d'après Sharon *et al.* [16].

Tableau 2 : Détail des lignées cellulaires employées dans cette étude.

Tableau 3 : Schémas de traitement des anticorps inhibiteurs de checkpoints immunitaires.

Tableau 4 : Cycle de déshydratation des tissus avant enrobage en paraffine.

Tableau 5 : Anticorps employés pour les quantifications des populations de lymphocytes T effecteurs et régulateurs.

Tableau 6 : Dénominations des cytokines et chimiokines dosées.

Tableau 7 : Poids médians des tumeurs pour chaque groupe et chaque modèle.

Tableau 8 : *Ratios* T/C par modèle et par anticorps.

Tableau 9 : Combinaisons d'anticorps étudiées dans le modèle 4T1.

Tableau 10 : Taux de mortalité après le dernier traitement pour les monothérapies et combinaisons évaluées dans le modèle 4T1.

Tableau 11 : Résumé de la sensibilité aux ICI de différents modèles.

Liste des figures

Figure 1 : Les six propriétés du cancer selon Hanahan et Weinberg en 2000 [1].

Figure 2 : Les quatre nouvelles propriétés du cancer selon Hanahan et Weinberg en 2011 [2].

Figure 3 : Cycle d'élimination d'une tumeur par le système immunitaire selon Chen et Mellman [6].

Figure 4 : Immunosurveillance et immunoédition selon Dunn et Schreiber [8].

Figure 5 : Les mécanismes d'échappement tumoral selon Shore [8].

Figure 6 : L'élimination, première phase de l'immunoédition selon Mittal *et al.* [5].

Figure 7 : Signaux impliqués dans la phase d'échappement tumoral selon Mittal *et al.* [5].

Figure 8 : Les checkpoints immunitaires d'après Pardoll [15].

Figure 9 : Fonctionnement d'un inhibiteur de checkpoint immunitaire (ICI) : l'Ipilimumab selon Azijli *et al.* [19].

Figure 10 : Rôle de CTLA-4 dans l'inhibition des lymphocytes T effecteurs selon Buchbinder et Desai [20].

Figure 11 : Rôle de CTLA-4 exprimé par les lymphocytes T régulateurs selon Buchbinder et Desai [20].

Figure 12 : Rôle de PD1 dans l'inhibition des lymphocytes T selon Buchbinder et Desai [20].

Figure 13 : Stratégie de combinaison radiothérapie/immunothérapie d'après Medler *et al.* [29].

Figure 14 : Distribution des glandes mammaires chez la souris selon Green *et al.* [37].

Figure 15 : Distribution des ganglions chez la souris selon Green *et al.* [37].

Figure 16 : Stratégie de gating pour quantification des populations de lymphocytes T effecteurs et régulateurs par cytométrie en flux.

Figure 17 : Evolution de la croissance tumorale de trois modèles tumoraux in vivo (4T1 (A), EMT-6 (B) et CT26 (C)) traités avec deux ICI au cours du temps.

Figure 18 : Courbes individuelles de croissance tumorale pour chaque modèle et chaque groupe.

Figure 19 : Comptages macroscopique des métastases pulmonaires dans le modèle 4T1.

Figure 20 : *Ratios* individuels Teff/Treg au sein de la tumeur par modèle et par groupe.

Figure 21 : Corrélation entre le *ratio* Teff/Treg et la croissance tumorale pour le modèle EMT-6.

Figure 22 : *Ratios* individuels Teff/Treg au sein des ganglions drainants la tumeur, par modèle et par groupe.

Figure 23 : Effets d'un anticorps agoniste anti-4-1BB sur la réponse immunitaire selon Bartkowiak et Curran [45].

Figure 24 : Comparaison de l'efficacité anti-tumorale de deux clones anti-CTLA-4.

Figure 25 : Efficacité anti-tumorale de quatre ICI chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1.

Figure 26 : Comparaison des taux de cytokines et chimiokines circulantes chez des souris porteuses de tumeur 4T1 et traitées avec différents ICI.

Figure 27 : Efficacité anti-tumorale de l'anti-PD1, de l'anti-4-1BB et de la combinaison des deux chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1.

Figure 28 : Photographies représentatives d'infiltrations lymphocytaires pulmonaires chez des souris porteuses de tumeurs 4T1 et traitées à l'anti-PD1 et/ou l'anti-4-1BB.

Figure 29 : Effets de l'anti-PD1, de l'anti-4-1BB et de la combinaison des 2 sur le poids des rates de souris porteuses de tumeurs 4T1.

Figure 30 : Comparaison des taux de cytokines et chimiokines circulantes chez des souris porteuses de tumeur 4T1 et traitées à l'anti-PD1 et/ou à l'anti-4-1BB.

Figure 31 : Efficacité anti-tumorale de l'anti-PD-L1, de l'anti-4-1BB ou de la combinaison des deux chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1.

Figure 32 : Photographies représentatives d'infiltrations lymphocytaires pulmonaires chez des souris porteuses de tumeurs 4T1 et traitées à l'anti-PD-L1 et/ou l'anti-4-1BB.

Figure 33 : Effets de l'anti-PD-L1, de l'anti-4-1BB et de la combinaison des 2 sur le poids des rates de souris porteuses de tumeurs 4T1.

Figure 34 : Comparaison des taux de cytokines et chimiokines circulantes chez des souris porteuses de tumeur 4T1 et traitées à l'anti-PD-L1 et/ou à l'anti-4-1BB.

Figure 35 : Efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4, de l'anti-4-1BB ou de la combinaison des deux chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1.

Figure 36 : Photographies représentatives d'infiltrations lymphocytaires pulmonaires chez des souris porteuses de tumeurs 4T1 et traitées à l'anti-CTLA-4 et/ou l'anti-4-1BB.

Figure 37 : Effets de l'anti-CTLA-4, de l'anti-4-1BB et de la combinaison des deux sur le poids des rates de souris porteuses de tumeurs 4T1.

Figure 38 : Comparaison des taux de cytokines et chimiokines circulantes chez des souris porteuses de tumeur 4T1 et traitées à l'anti-CTLA-4 et/ou à l'anti-4-1BB.

Figure 39 : Efficacité anti-tumorale de l'anti-PD1, de l'anti-4-1BB ou de la combinaison des deux chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1 (A) ou EMT-6 (B).

Figure 40 : Profils d'expressions cytokiniques « répondeurs moins non répondeurs » dans le modèle 4T1.

Figure 41 : Profils d'expressions cytokiniques « répondeurs moins non répondeurs » dans le modèle EMT-6.

Figure 42 : Corrélation entre la sensibilité aux ICI et le taux de mutations.

Liste des abréviations

AAALAC: *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care*

ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AMP: Adénosine MonoPhosphate

APC: Antigen Presenting cell

APC-Cy7: AlloPhycoCyanin-Cy7

ATCC: American Type Culture Collection

B7RP1: B7-Related Protein 1

BCG: vaccin Bilié de Calmette et Guérin

Bcl2: B-cell lymphoma 2

BTLA: B and T Lymphocyte Attenuator

CCR4: C-C Chemokine Receptor type 4

CD (CD8; CD4; ...): Cluster of Differentiation

CGFL: Centre Georges-François Leclerc

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNREEA: Comité National de Réflexion sur l'Éthique sur l'Expérimentation Animale

Cox2: Cyclo oxygénase 2

CRBC: Centre de Ressources Biologiques et Chimiques

CTL: Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4

CTX: Chemotherapy

D (D0; D1; ...) : Day (Day 0 ; Day 1 ; ...)

DAMPs: Damage Associated Molecular Patterns

DC: Dendritic cell

EOPS : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques

EPI : Equipement de Protection Individuel

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

FasL: Fas-Ligand

FDA: Food and Drug Administration

FELASA: FEderation for Laboratory Animal Science Associations

FoxP3: Forkhead box P3

FSC: Forward-SCatter light (FACS)

GAL-9: Galectin-9

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GITR: Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor receptor-Related (receptor)

GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

GZMB : Granzyme B

HEPA: High Efficiency Particulate Air

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2

HES: Hematoxyline-Eosine-Safran

HVEM: HerpesVirus Entry Mediator

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

ICI: Inhibiteur de Checkpoint Immunitaire

ICOS: Inducible T cell CO-Stimulator

IDO: Indoleamine 2,3-DiOxygenase

iNOS : inducible Nitric Oxyde Synthase

IFN- γ : InterFeroN- γ

IgG1: Immunoglobuline G 1

IL (IL1; IL2; ...): InterLeukine

IP: Intra-Péritonéale

IP-10: Interferon gamma-induced Protein 10

IrAEs: Immune-related Adverse Events

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

KC: Keratinocyte Chemoattractant

KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor

LAG-3: Lymphocyte Activation Gene 3

M Φ / M1 / M2: Macrophages / Type M1 / Type M2

mAb: monoclonal Antibody

MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein 1

MDSC: Myeloid Derived Supressor cell

MHC: Major Histocompatibility Complex

MICA/B: Major histocompatibility complex class I-related Chain A/B

MIP-1 α / MIP-1 β / MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein 1 α / 1 β / 2

NCI: National Cancer Institute

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

NK (lymphocytes): Natural Killer

NKG2D / NKG2DL: Natural Killer Group 2D (receptor) / NKG2D Ligand

NKT: Natural Killer T (lymphocyte)

NNMU: N-nitroso-N-MethylUrethane

NO: Oxyde Nitrique

NRC: National Research Council

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PBS: Phosphate Buffered Saline

PD1: Programmed Death 1

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1

PE: PhycoErythrine

PerCP: Peridinin Chlorophyll Protein

PGE2: ProstaGlandine E2

R&D: Recherche & Développement

RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

RFID: Radio Frequency IDentification

ROS: Reactive Oxygen Species

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT: RadioThérapie

SSC: Side-SCattered light (FACS)

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TCR: T Cell Receptor

Teff: T effecteurs (lymphocytes)

TGF- β : Tumor Growth Factor- β

Th1 / Th2 / Th17...: T helper 1 / 2 / 17... (Lymphocytes)

TIM-3: T cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TRAIL / TRAILR: Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand / TRAILReceptor

Treg: T régulateur (lymphocyte)

TW: Twice a Week

UCB : Union Chimique Belge

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

1. Introduction

1.1. Présentation de l'entreprise

Créée il y a plus de 20 ans par le Dr. Philippe Genne, PDG et actionnaire principal, Oncodesign est une entreprise biotechnologique dont l'activité consiste à maximiser les chances de succès de l'industrie pharmaceutique pour découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques contre les cancers et autres maladies graves sans traitement efficace connu.

Fort d'une expérience acquise auprès de plus de 600 clients, dont les plus grandes entreprises pharmaceutiques du monde, Oncodesign s'appuie sur une plateforme technologique complète, alliant chimie médicinale, pharmacologie et imagerie médicale de pointe pour évaluer et prédire le potentiel thérapeutique de chaque molécule. Cette plateforme inclut donc 700m² d'animalerie pour rongeurs et 500 m² de laboratoires hébergeant des services d'histologie, de culture cellulaire, de biologie moléculaire, de chimie et biologie analytiques, de pharmacologie in vivo, d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et d'imagerie photonique. Grâce à sa position géographique privilégiée, au cœur du pôle universitaire et hospitalier dijonnais et grâce à des partenariats multiples, Oncodesign profite également des plateformes avoisinantes permettant notamment un accès aux technologies de pointe utilisant la radioactivité, telles que l'imagerie nucléaire, la radiothérapie ou le radiomarquage.

Cette activité de service permet en outre de financer le propre programme de recherche et développement d'Oncodesign. Parmi les axes de recherche développés, la découverte de nouveaux inhibiteurs de kinases est en première ligne. Ces molécules représentent un marché estimé à plus de 46 milliards de dollars en 2016 et près de 25% des investissements en R&D de l'industrie pharmaceutique. Nanocyclix[®], la technologie d'Oncodesign qui a conduit à l'établissement d'une chimiothèque conséquente et puissante a déjà permis de cibler plusieurs molécules d'intérêts à fort potentiel thérapeutique, en oncologie et hors-oncologie, et de signer des partenariats de co-développement avec des groupes pharmaceutiques mondiaux tels que Bristol-Myers Squibb ou UCB (Union Chimique Belge).

Enfin, depuis 2016, Oncodesign s'est implanté aux Ulis, au sein du cluster de Paris-Saclay, en acquérant le Centre de Recherche François Hyafil et les compétences de son personnel, notamment en chimie. Oncodesign compte ainsi 165 collaborateurs et dispose également de filiales au Canada et aux États-Unis afin de développer le marché nord-

américain. A l'été 2017, une partie des activités de Bertin Pharma devrait rejoindre également Oncodesign afin de renforcer et diversifier l'offre de services et assoir sa position d'acteur incontournable vis-à-vis de ses partenaires pharmaceutiques et scientifiques.

1.2. Cancer et système immunitaire

1.2.1. Généralités à propos du cancer

Le cancer est très complexe à définir tant il existe de types et de sous types de tumeurs d'origines diverses. Aussi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le mot « cancer » comme étant un terme général attribué à un grand groupe de maladies (Source : <http://www.who.int/topics/cancer/fr/>). Si sa définition est donc difficile à établir, la communauté scientifique a, en revanche, approuvé les 6 propriétés qui lui ont été attribuées par Hanahan et Weinberg en 2000. Décrites dans la **Figure 1**, Ces propriétés acquises progressivement durant un processus long et complexe de transformation cellulaire sont : l'échappement à l'apoptose, l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, un phénotype invasif et métastasant, un potentiel répliatif illimité et enfin la capacité à induire l'angiogenèse [1].

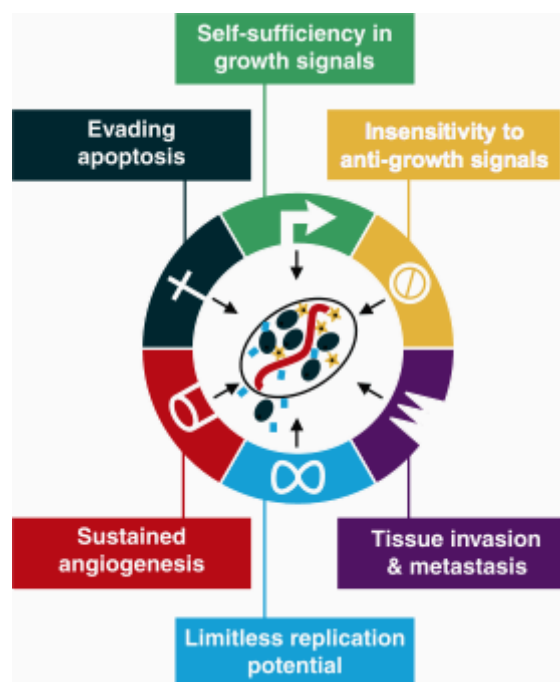


Figure 1 : Les six propriétés du cancer selon Hanahan et Weinberg en 2000 [1].

Ainsi, pendant plusieurs décennies, le cancer a été considéré comme une maladie des gènes ; à juste titre puisque les altérations du génome sont le départ du processus de

cancérisation. Par conséquent, les recherches et les traitements étaient orientés vers une ou plusieurs de ces propriétés au niveau génomique, comme par exemple les agents alkylants ou la radiothérapie agissant directement au niveau de l'ADN. Au cours des années 1990-2000, les avancées scientifiques ont permis de considérer le cancer plutôt comme une maladie de l'organisme, en prenant en compte des éléments déterminants directement liés aux cellules cancéreuses tels que le microenvironnement tumoral et le système immunitaire. Suite à ces nouvelles considérations, Hanahan et Weinberg ont ajouté, en 2011, 4 nouvelles propriétés à leur concept initial, portant à 10 le nombre de caractéristiques reconnues du cancer ; ce qui traduit bien la complexité de cette pathologie. Ces nouvelles propriétés, présentées dans la **Figure 2**, sont la reprogrammation du métabolisme énergétique, l'échappement au système immunitaire, l'instabilité du génome et l'entretien d'un environnement inflammatoire pro-tumoral [2].

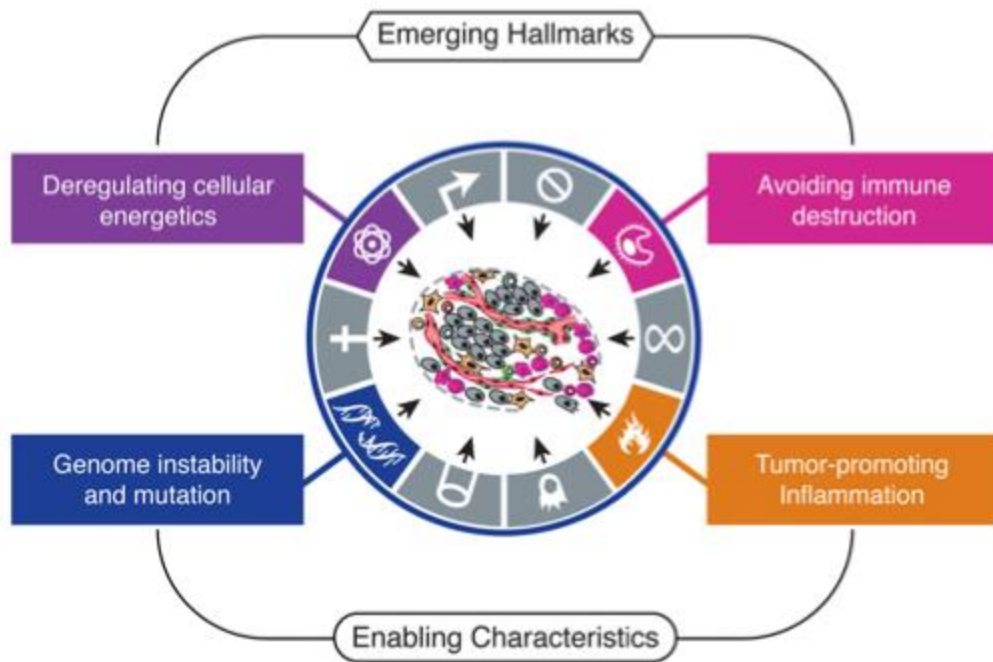


Figure 2 : Les quatre nouvelles propriétés du cancer selon Hanahan et Weinberg en 2011 [2].

Parmi cette dernière représentation, l'immunité présente un rôle déterminant *via* sa capacité de détruire les cellules tumorales mais aussi à les promouvoir par des mécanismes inflammatoires. Ce rôle est profondément étudié depuis quelques années, notamment dans son potentiel thérapeutique, même si dès le début du 20^{ème} siècle, Paul Ehrlich établissait déjà un lien hypothétique entre cancer et immunité. Ce lien avait été traduit par Burnet et Thomas dans les années 60 par le concept d'immunosurveillance [3].

1.2.2. L'immunosurveillance et l'immunoédition

Selon Burnet et Thomas, le système immunitaire contrôle sans arrêt la conformité des cellules de l'organisme et parvient à détruire de multiples foyers néoplasiques à leur naissance. En revanche, il arrive parfois qu'une cellule cancéreuse passe au travers des mailles du filet et parvienne à se développer et former une tumeur. Ce concept d'immunosurveillance a été prouvé expérimentalement au cours des années 90 – 2000, notamment grâce aux avancées technologiques de l'époque en génomique et à l'apparition des anticorps monoclonaux. Brièvement, en injectant une substance cancérogène à forte dose chez des souris, des tumeurs se développent. En réduisant la dose, le nombre d'animaux atteints diminue significativement. Toutefois, lorsqu'on supprime les lymphocytes T de ces mêmes souris, l'un des acteurs principaux de l'élimination du non soi, les tumeurs apparaissent de nouveau [4, 5]. Ainsi, comme l'explique la **Figure 3**, ces observations indiquent que les tumeurs peuvent être détruites par le système immunitaire.

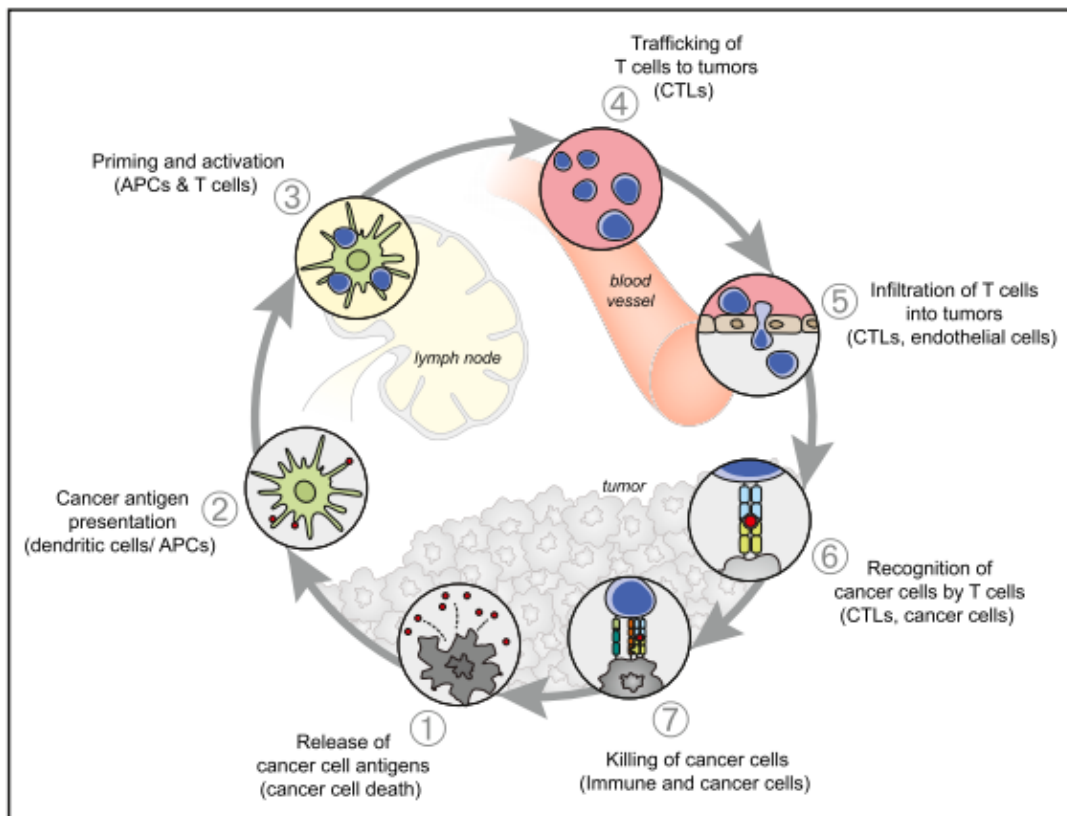


Figure 3 : Cycle d'élimination d'une tumeur par le système immunitaire selon Chen et Mellman [6]. Ce cycle est divisé en 7 étapes. 1 : largage des antigènes tumoraux (suite à la mort cellulaire). 2 : assimilation et présentation de ces antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) dont font partie les cellules dendritiques. 3 : Activation des

lymphocytes T au niveau des ganglions par reconnaissance des antigènes présentés par les APC via le récepteur TCR des lymphocytes (TCR = T cell receptor = récepteur des cellules T). 4 : Migration vers la tumeur des lymphocytes T activés et polarisation en lymphocytes T cytotoxiques (CTL = cytotoxic T lymphocyte = lymphocyte T cytotoxique) dits lymphocytes T effecteurs ou encore lymphocytes T CD8+. 5 : Infiltration de ces lymphocytes dans la tumeur. 6 : Reconnaissance des antigènes tumoraux par les lymphocytes infiltrés. 7 : Destruction des cellules cancéreuses reconnues.

Au cours des années 2000, le concept binaire de l'immunosurveillance (destruction ou non de la tumeur) a été enrichi et a été remplacé par l'immunoédition. Selon ce principe, le système immunitaire pourrait, parfois, en raison de la pression de sélection qu'il impose, promouvoir malgré lui l'apparition de tumeurs peu immunogènes capables d'échapper à leur destruction. Plus précisément, il se compose de 3 étapes décrites dans la **Figure 4** : l'élimination, qui correspond à l'immunosurveillance telle que décrite précédemment est la première étape. Si toutes les cellules ne sont pas détruites, vient alors une phase d'équilibre lors de laquelle les cellules restantes sont maintenues sous contrôle dans des conditions particulières encore assez mal connues. En effet, il est impossible de collecter des échantillons tumoraux de patients à ce stade puisque le diagnostic n'a pas encore eu lieu et il n'existe pas encore de modèle expérimental capable de reproduire ces conditions. Les interactions locales entre la tumeur et le système immunitaire peuvent enfin favoriser les clones tumoraux moins immunogènes que les cellules originales et ne subissant pas la pression des défenses de l'organisme. En se développant, ces clones peuvent aboutir à la formation de tumeurs ; c'est la phase d'échappement [7, 8, 9].

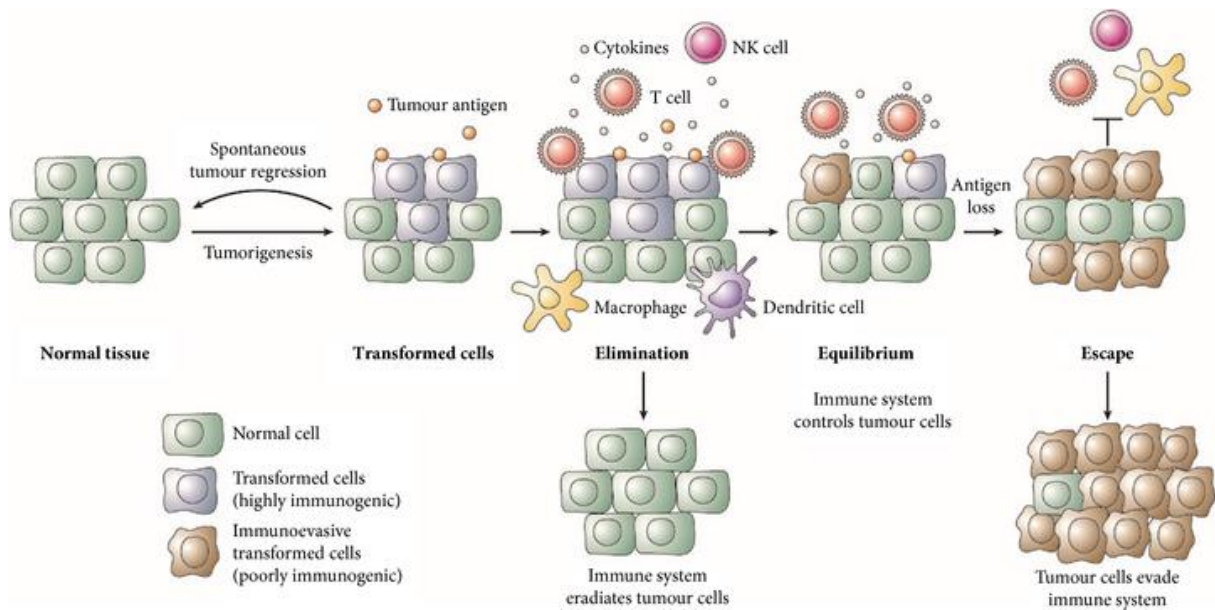


Figure 4 : Immunosurveillance et immunoédition selon Dunn et Schreiber [8].

Les **Figures 3 et 4** ont d'ores et déjà permis d'identifier plusieurs types cellulaires, notamment lymphoïdes, impliqués dans la réponse immunitaire tels que les lymphocytes T ou les lymphocytes NK. Les interactions entre eux et la tumeur sont nombreuses, parfois redondantes et liées également à des populations cellulaires tierces, reflétant la complexité des processus mis en jeu. Ainsi, c'est en profitant des faiblesses de ces processus que les tumeurs peuvent apparaître et se développer *via* 3 mécanismes différents qui sont, comme présentés dans la **Figure 5**, la perte d'antigénicité, la perte d'immunogénicité et la polarisation immunosuppressive du microenvironnement tumoral.

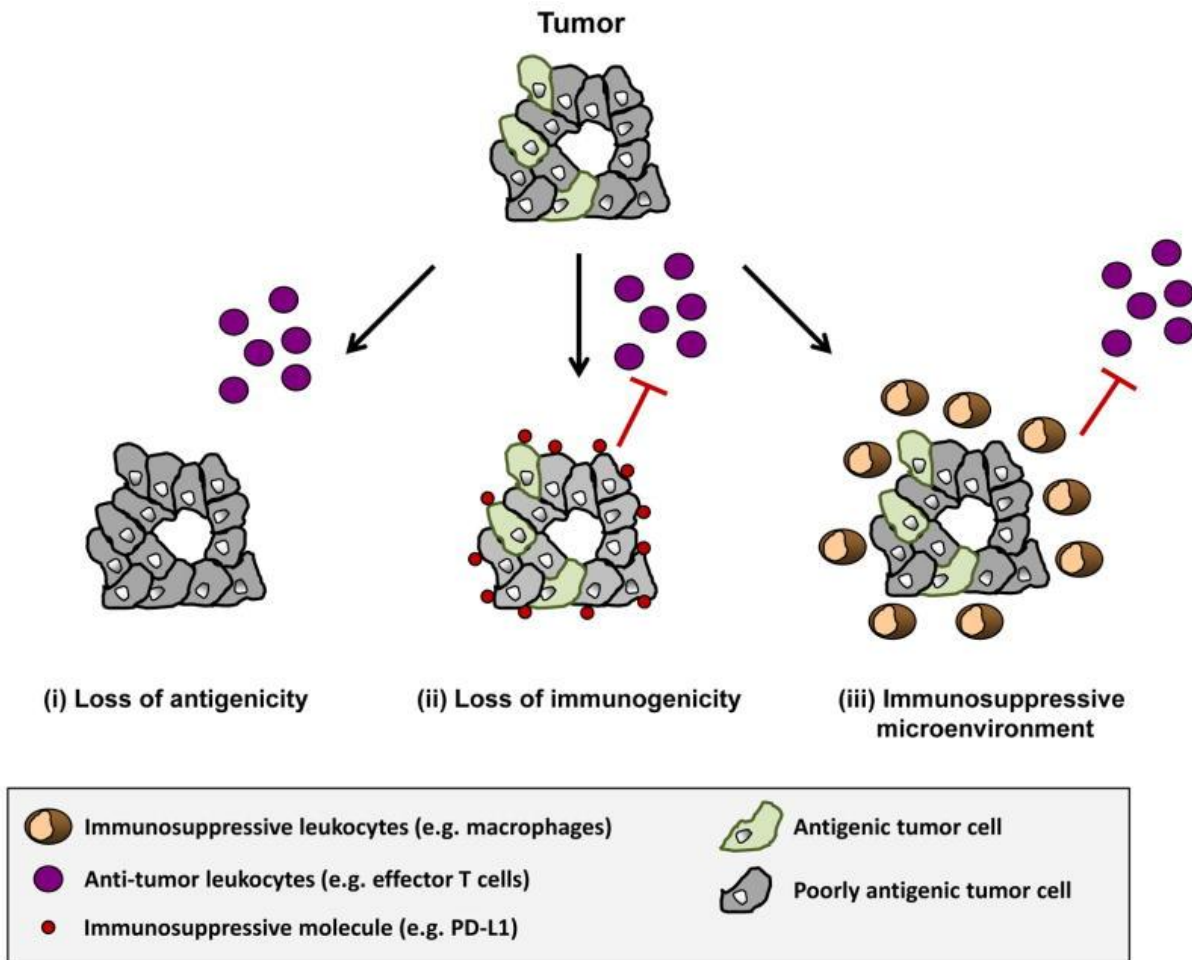


Figure 5 : Les mécanismes d'échappement tumoral selon Shore [8]. (i) La perte de l'antigénicité peut se produire par exemple avec l'apparition de mutations de gènes impliqués dans les voies de production d'antigènes. En l'absence d'antigènes spécifiques, le système immunitaire ne peut pas reconnaître les cellules tumorales comme étant du non soi. (ii) Si cette perte se traduit par une diminution de l'immunogénicité, certaines tumeurs parviennent également à gagner des propriétés immunosuppressives supplémentaires telles que l'expression membranaire de PD-L1 ou encore l'excrétion de cytokines pro-tumorales comme l'IL-10 ou le TGF- β qui pourront inhiber la réponse anti-tumorale. (iii) Enfin, les tumeurs peuvent aussi échapper au système immunitaire en orchestrant la mise en place d'un microenvironnement favorable à leur croissance par le recrutement de populations cellulaires inhibant la réponse immunitaire.

1.2.3. Les acteurs cellulaires et moléculaires de la réponse au développement tumoral

Le système immunitaire est très complexe et la réponse anti-tumorale a fait l'objet de nombreuses études pour décrire les mécanismes qui entrent en jeu dans ce processus. Cette réponse implique à la fois l'immunité adaptative, principalement représentée dans cette pathologie par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, et l'immunité innée *via* les lymphocytes NK et certaines populations granulocytaires et phagocytaires [10]. Depuis quelques années, des recherches portent également sur les lignées de cellules B qui semblent jouer un certain rôle sans avoir pour autant l'impact qu'ont les cellules T [11, 12]. Comme décrit précédemment, les cellules présentatrices d'antigènes (principalement les cellules dendritiques) ont également un rôle clé dans l'activation des lymphocytes. La **Figure 6** présente de manière simplifiée les relations entre la tumeur et ces différents types cellulaires durant la phase d'élimination.

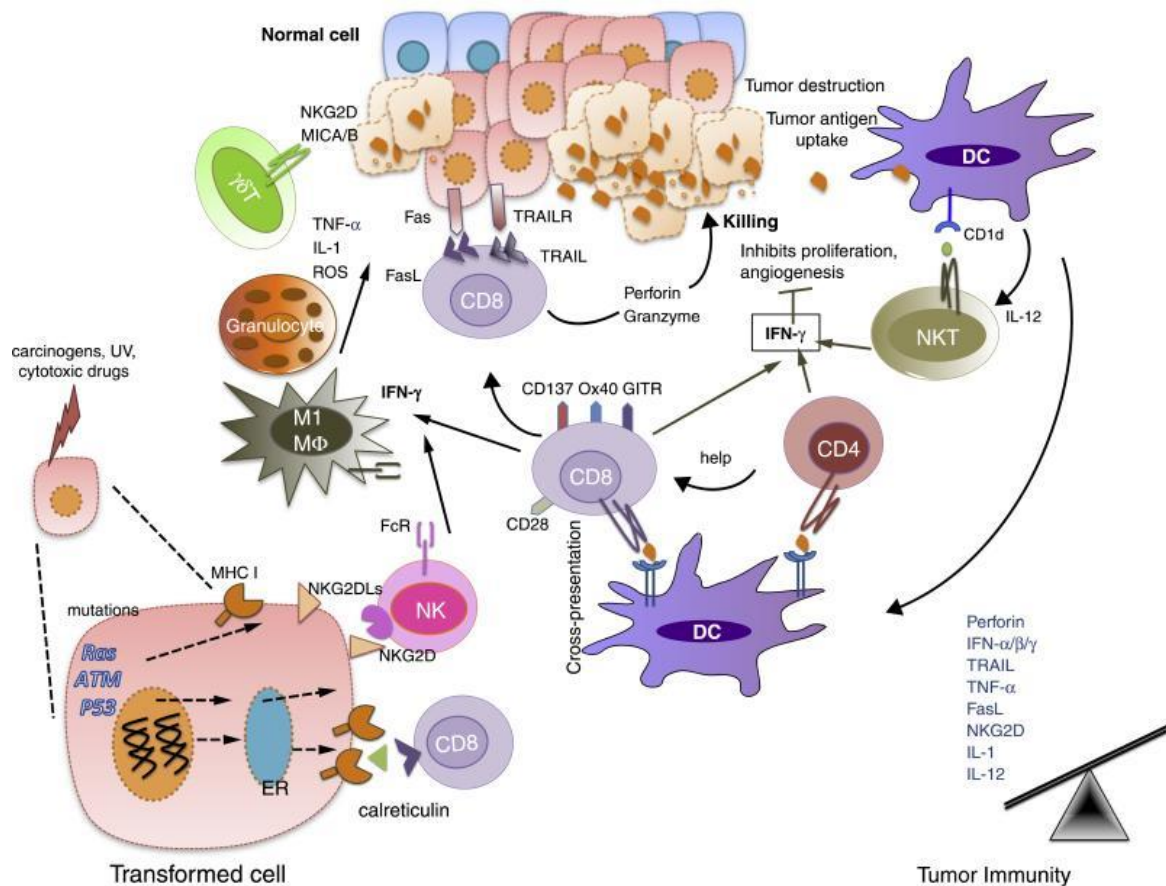


Figure 6 : L'élimination, première phase de l'immunoédition selon Mittal *et al.* [5]. *En bas à gauche :* Une cellule normale transformée en cellule tumorale exprime des antigènes de stress qui sont naturellement reconnus soit par des lymphocytes T CD8⁺ via l'interaction

CMH-TCR (Complexe Majeur d'Histocompatibilité – T Cell Receptor / Récepteur des cellules T) aboutissant à un premier processus de destruction, soit par les lymphocytes NK via le récepteur NKG2D. Ce récepteur est capable de reconnaître une famille de protéines exprimées par les cellules malignes ou infectées et aboutissant notamment à la sécrétion d'interféron gamma (IFN- γ) (cytokine anti-tumorale). A droite : Les cellules dendritiques (DC, Dendritic cell) présentent également de manière croisée ces antigènes aux lymphocytes T (CD8+, CD4+, NKT) afin d'accroître la puissance du signal. S'en suit l'activation des cellules immunitaires reconnues, majoritairement au sein des ganglions drainant la tumeur, aboutissant également à la sécrétion d'IFN- γ . Les lymphocytes CD4+, dits auxiliaires ou helper, régulent et orchestrent la réponse immunitaire et principalement l'action des lymphocytes CD8+ qui portent l'activité cytotoxique via la sécrétion de perforine et de granzyme au contact de la tumeur. Les macrophages et granulocytes participent enfin à la réponse anti-tumorale notamment par sécrétion de cytokines et chimiokines anti-tumorales.

La réponse anti-tumorale est donc plutôt bien caractérisée et dépend principalement des lymphocytes T CD8+ dits effecteurs ou cytotoxiques avec une modulation par de nombreux autres types cellulaires et cytokines. A contrario, la phase d'équilibre est assez mal connue puisqu'il est difficile de reproduire cet état chez l'animal et peu de descriptions ont été faites chez l'homme [5]. Il a toutefois été décrit qu'au sein de tels tissus en dormance coexistent des signaux et cellules pro et anti-tumoraux qui s'annulent, aboutissant à une absence de réaction. Enfin, la phase d'échappement se traduit par le basculement de ces signaux vers un contexte pro-tumoral permettant à la tumeur de progresser à nouveau. Ces signaux sont représentés dans la **Figure 7**.

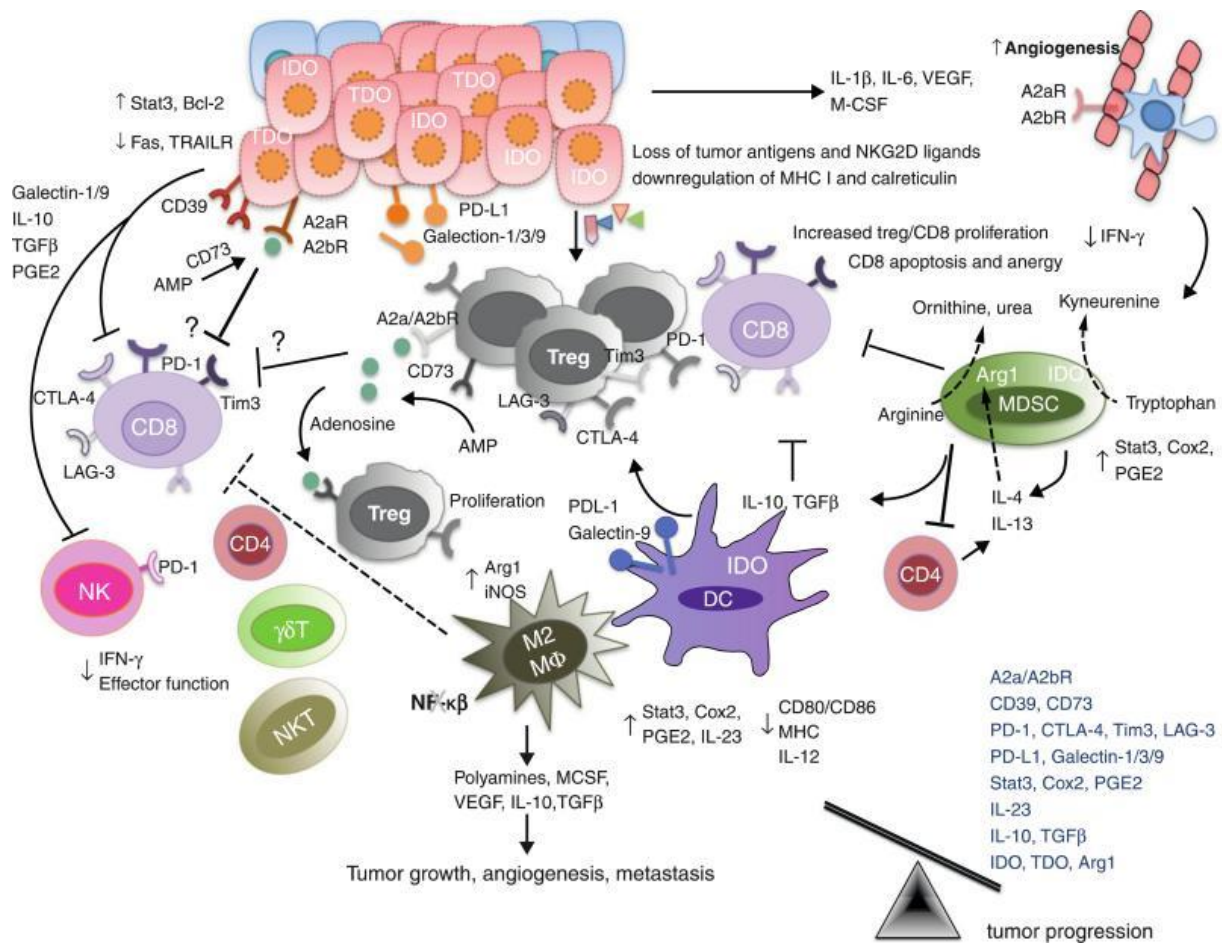


Figure 7 : Signaux impliqués dans la phase d'échappement tumoral selon Mittal *et al.* [5]. En haut : Durant les phases d'équilibre et d'échappement, la tumeur perd ses caractéristiques immunogènes et acquiert la capacité à exprimer des molécules permettant d'améliorer sa résistance (STAT-3), sa survie (bcl2) et l'environnement immunosuppresseur (PD-L1, CD73, IDO, ...) ainsi que des cytokines favorisant l'angiogénèse (VEGF, M-CSF, ...). Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC, myeloid-derived suppressor cells), les macrophages de type M2 et les cellules dendritiques (DC) inhibent la réponse anti-tumorale par expression de molécules régulatrices (arginase, IDO, iNOS), par sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF-β) capables d'inhiber les lymphocytes T CD8+ et enfin en favorisant la prolifération des lymphocytes T régulateurs (Treg) ayant dans ce cas une activité inhibitrice sur les lymphocytes T CD8+.

La **Figure 7** met en évidence des populations de cellules présentant un rôle dans l'échappement tumoral et donc, qui ne sont pas présentes durant la phase d'élimination, lors de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces populations sont constituées principalement des cellules MDSC et de lymphocytes T régulateurs (Treg) recrutés par des facteurs tumoraux

telles que les prostaglandines, le G-CSF, le GM-CSF, l'IL-6, etc. Leur rôle au sein d'un organisme sain est d'inhiber les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, NK et les cellules dendritiques afin de maîtriser la réaction immunitaire et prévenir les dommages tissulaires qui pourraient être causés par un emballement de ce processus. En revanche, dans le contexte du cancer, elles empêchent les cellules effectrices de détruire les cellules cancéreuses. En outre, cette inhibition est véhiculée en partie par des signaux chimiques (ROS, NO, arginase) et cytokiniques et en partie par des interactions de contact *via* des protéines membranaires appelées checkpoints immunitaires (PD1, CTLA-4, Tim3, etc.). Toutes ces molécules sont donc autant de cibles potentielles pour restaurer une réponse forte et efficace contre la tumeur [5, 13, 14].

1.3. Les checkpoints immunitaires

L'amplitude et la qualité de la réponse immunitaire induite par les lymphocytes T après reconnaissance de l'antigène par le TCR dépend d'une balance de signaux stimulateurs et inhibiteurs médiés par ces checkpoints et émis simultanément avec la reconnaissance antigénique. Il est en effet établi que l'interaction seule d'un antigène et du TCR est insuffisante pour initier une réponse de protection qui nécessite notamment la liaison simultanée de CD80 et CD86 (autrement appelés B7-1 et B7-2) exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes et de CD28 exprimé par les lymphocytes T en quantité suffisante. En conditions physiologiques normales, ces checkpoints sont des points clés dans la régulation du système immunitaire et sont indispensables pour maintenir la tolérance du soi et donc prévenir les maladies auto-immunes. De plus ils permettent de protéger les tissus de l'hôte lorsque le système immunitaire répond à une infection par des agents exogènes. Dans le cadre du cancer, les cellules tumorales parviennent à détourner ces signaux à leur avantage afin d'inhiber le système immunitaire [15, 16, 17].

Concrètement, les checkpoints immunitaires sont des protéines membranaires exprimées par différents types cellulaires (cellules présentatrices d'antigènes, lymphocytes T, cellules tumorales, ...) dont les interactions sont de type ligand/récepteur. La majorité de ces interactions ont lieu au niveau ganglionnaire : après captation et présentation des antigènes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, ces dernières migrent vers les ganglions les plus proches pour aller activer les lymphocytes T naïfs. Le contact peut avoir lieu également dans les tissus périphériques et, notamment, directement au sein de la tumeur. Les checkpoints ont soit un rôle d'activation (comme 4-1BB ou OX40), soit un rôle d'inhibition

(comme PD1 ou CTLA-4) et agissent systématiquement en parallèle du signal acquis *via* le TCR. Ainsi, les maladies génétiques caractérisées par une déficience en protéines CTLA-4 sont associées à des réactions d'auto-immunité et à une prolifération lymphocytaire. Egalement, certains ligands peuvent présenter une affinité à la fois pour un récepteur de stimulation et pour un récepteur d'inhibition. Ces 2 récepteurs sont en réalité exprimés selon une cinétique précise : les lymphocytes T naïfs expriment plutôt les récepteurs activateurs puis, après activation, expriment les récepteurs inhibiteurs pour anticiper le retour à l'homéostasie et prévenir un emballement du système immunitaire qui pourrait s'avérer dangereux pour les tissus sains et pour l'hôte [17].

A l'heure actuelle, toutes ces molécules ne sont pas encore identifiées. Néanmoins, la plupart appartient soit à la famille des protéines B7 dont les membres appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, soit à la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor, facteur de nécrose tumorale), soit à la famille des cytokines solubles qui sont sécrétées dans le microenvironnement tumoral. La **Figure 8** présente plusieurs de ces points de contrôle dont les rôles parfois redondants permettent de garantir l'orientation du signal à émettre.

Les récepteurs et ligands responsables de l'inhibition des lymphocytes T sont couramment surexprimés à la surface des cellules tumorales. Ainsi, ces checkpoints sont des cibles de choix pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques, ne visant pas directement la tumeur mais le système immunitaire de l'hôte afin de rétablir une activité anti-tumorale.

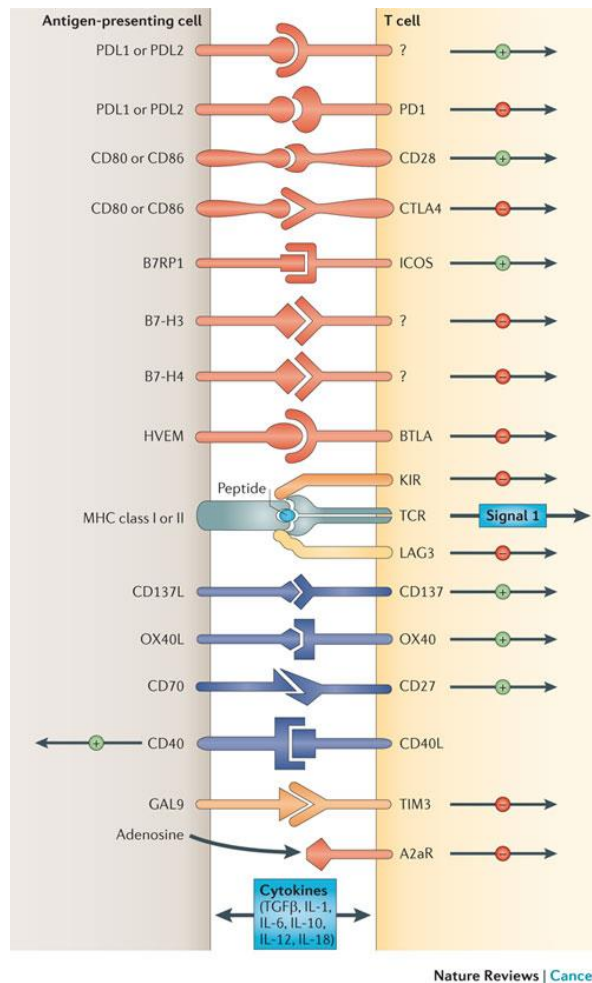


Figure 8 : Les checkpoints immunitaires d'après Pardoll [15]. *Les relations APC-Lymphocyte T sont bidirectionnelles mais agissent principalement sur les lymphocytes T. A2aR, adenosine A2a receptor ; B7RP1, B7-related protein 1 ; BTLA, B and T lymphocyte attenuator ; GAL9, galectin 9 ; HVEM, herpesvirus entry mediator ; ICOS, inducible T cell co-stimulator ; IL, interleukin ; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor ; LAG3, lymphocyte activation gene 3 ; PD1, programmed cell death protein 1 ; PDL, PD1 ligand ; TGFβ, transforming growth factor-β ; TIM3, T cell membrane protein 3.*

1.4. Immunothérapie

1.4.1. Historique

L'immunothérapie, dans le cadre du cancer, a été initiée dans les années 1970 par les traitements du cancer de la vessie avec le vaccin BCG et du mélanome avec l'interféron. Ces traitements sont classés dans la catégorie des immunothérapies actives, car stimulant directement le système immunitaire, et non spécifiques, puisque ces traitements ne ciblent pas directement la tumeur mais le système immunitaire. Par la suite, de nouveaux traitements

actifs non spécifiques ont été mis au point, tels que l'IL2 pour les tumeurs solides, mais avec des résultats moindres et une toxicité importante aboutissant à une baisse d'intérêt pour ce type de thérapie [8, 18].

Depuis les années 1990, les thérapies spécifiques, c'est-à-dire visant directement le cancer, ont vu le jour grâce à la découverte des antigènes tumoraux. Les traitements actifs autrement appelés vaccinations thérapeutiques consistent à éduquer le système immunitaire de l'hôte pour la reconnaissance des antigènes de sa tumeur. Pour cela, il est nécessaire de prélever, cultiver et manipuler des cellules tumorales et/ou des lymphocytes cytotoxiques avant de les réinjecter au patient pour engendrer une réponse anti-tumorale [8, 18].

Les traitements passifs sont produits par administrations d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces antigènes qui vont engendrer une réponse immunitaire. Le trastuzumab (Herceptin[®]) ciblant HER2 pour le cancer du sein ou le bevacizumab (Avastin[®]) ciblant le VEGF circulant pour le cancer du colon métastatique en sont 2 exemples représentatifs. Les thérapies par transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques activés contre un antigène particulier et amplifiés *in vitro* entrent également dans cette catégorie [8, 18].

Depuis les années 2000, les checkpoints immunitaires ont fait l'objet de nombreuses recherches. Etant donné que ces molécules sont de nature protéique et situées à la surface des cellules, les stratégies de traitement à base d'anticorps monoclonaux sont toutes indiquées. Aussi, selon la molécule visée, ces anticorps devront être soit agonistes soit antagonistes afin, respectivement, d'activer des récepteurs de stimulation ou de bloquer les récepteurs d'inhibition permettant ainsi, dans les 2 cas, l'activation des lymphocytes T CD8+. Il s'agit donc d'immunothérapies spécifiques et passives dont un exemple de fonctionnement est représenté dans la **Figure 9** avec un traitement anti-CTLA-4, l'Ipilimumab.

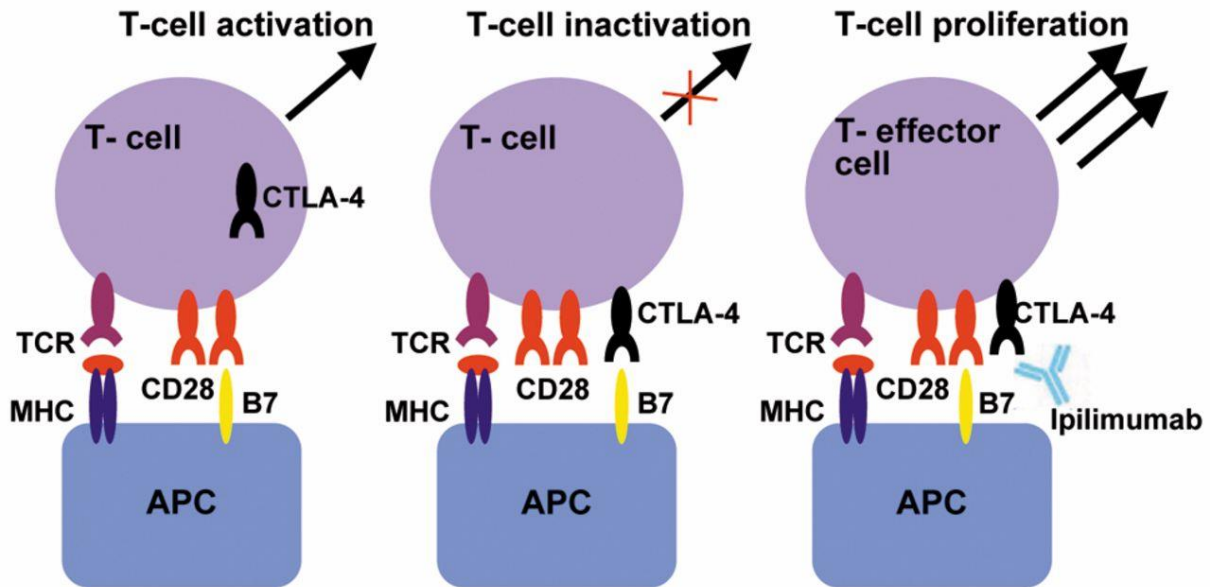


Figure 9 : Fonctionnement d'un inhibiteur de checkpoint immunitaire (ICI) : l'Ipilimumab selon Azijli et al. [19]. A gauche : La cellule présentatrice d'antigènes (APC) présente, via le complexe majeur d'histocompatibilité, un antigène tumoral à sa surface et migre vers un ganglion périphérique pour entrer en contact avec les lymphocytes T. L'interaction se produit via le TCR (récepteur aux antigènes des lymphocytes T). Un signal de co-stimulation est nécessaire pour l'activation du lymphocyte qui est représenté ici par l'interaction entre CD28 (côté lymphocyte) et B7 (côté APC). Au milieu : CTLA-4 est un homologue de CD28 qui a une meilleure affinité pour B7 et qui est en compétition avec CD28, mais dont le rôle est en revanche d'endormir le lymphocyte, ce qui se produit massivement dans un contexte tumoral immunosuppresseur. A droite : En administrant un anticorps anti-CTLA-4 tel que l'Ipilimumab, cette interaction est bloquée et le lien avec CD28 est favorisé permettant de rétablir la réponse immunitaire.

1.4.2. CTLA-4 et PD1

1.4.2.1. CTLA-4

Parmi la multitude de checkpoints immunitaires mis en évidence aujourd'hui, CTLA-4/B7 et PD1/PDL1 sont les 2 voies pour lesquelles les avancées scientifiques sont les plus importantes. Comme indiqué dans la **Figure 9**, CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4, antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques) est une protéine dont le but est d'inhiber l'activité cytotoxique lymphocytaire. Plus précisément, cette molécule est présente dans le cytoplasme des lymphocytes cytotoxiques naïfs autorisant ainsi un libre accès de CD28 à B7,

ce qui favorise l'activation des cellules. Lorsque l'interaction CD28-B7 a lieu, CTLA-4 est alors dirigé à la surface des cellules par exocytose, se lie à B7 à la place de CD28 inhibant la production de cytokines et la progression du cycle cellulaire. Comme représenté dans la **Figure 10**, la rapidité à laquelle les lymphocytes T effecteurs s'inhibent dépend de la spécificité de la reconnaissance de l'antigène [16, 20, 21, 22].

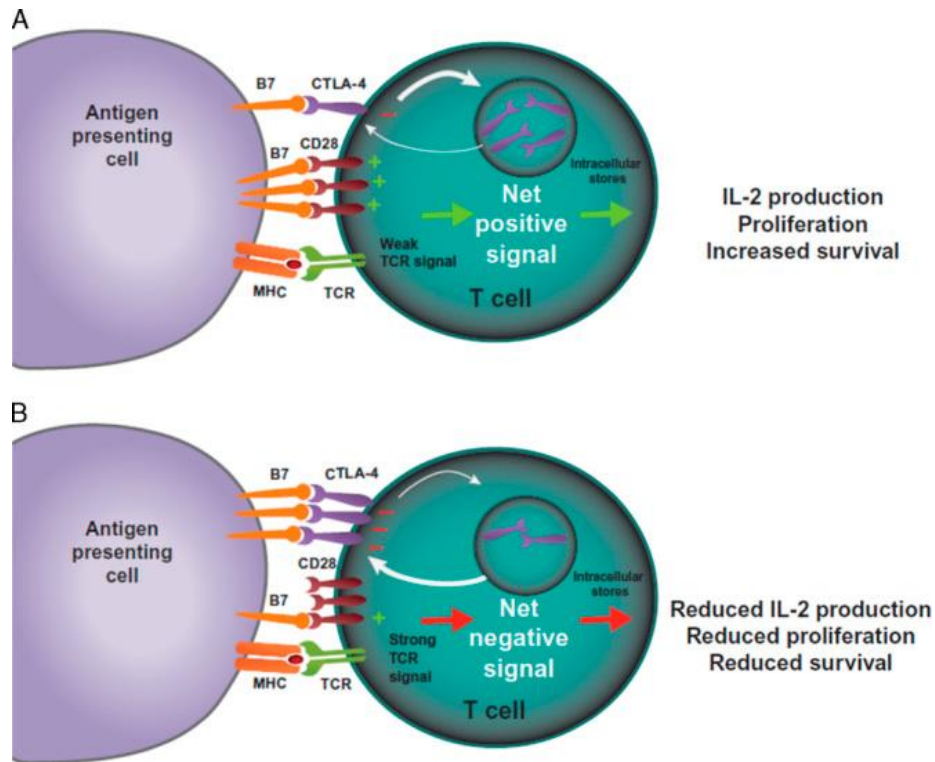


Figure 10 : Rôle de CTLA-4 dans l'inhibition des lymphocytes T effecteurs selon Buchbinder et Desai [20]. Les lymphocytes T sont activés par interaction de leur TCR avec le CMH des cellules présentatrices d'antigènes. A : En cas de faible interaction TCR-CMH, la liaison B7-CD28 prédomine induisant un fort signal de co-stimulation favorisant la prolifération, la survie cellulaire et la production d'interleukine 2. B : En cas de forte interaction TCR-CMH, les molécules de CTLA-4 sont dirigées à la surface de la cellule, entrant ainsi en compétition avec CD28 pour la liaison avec B7. La liaison avec CTLA-4 présentant une meilleure affinité, un signal inhibiteur est émis, réduisant la production d'interleukine 2, la prolifération et la survie cellulaire.

De manière surprenante, plus la spécificité du TCR pour l'antigène est forte, plus le lymphocyte est donc inhibé. En réalité, ce fonctionnement permet d'activer une plus grande diversité de lymphocytes pour un antigène donné malgré des interactions moins fortes. D'une part, cela permet à ces cellules de réagir également avec des épitopes antigéniques de

structure proche ou a des antigènes mutés pour un même agent infectieux par exemple. A contrario, une réponse immunitaire engendrée uniquement par des interactions fortes entre l'antigène et le TCR de quelques lymphocytes très spécifiques pourrait se retrouver rapidement dépassée et inutile si l'agent infectieux mute engendrant une modification de l'épitope antigénique. D'autre part, la spécificité du TCR envers l'antigène peut orienter la nature de la réponse pour chaque lymphocyte comme, par exemple, le profil d'expression cytokinique. Ainsi, ce fonctionnement permet une plus grande souplesse et une meilleure réactivité du système immunitaire envers les agents infectieux rencontrés [21, 22, 23].

De plus, CTLA-4 est également exprimé par les lymphocytes T régulateurs de manière constitutive et directement à leur surface. Il a en effet été démontré que la déficience en CTLA-4 chez ces cellules supprime leurs fonctions immunosuppressives. Les mécanismes d'immunosuppression impliqués *via* CTLA-4 ne sont pas encore très bien décrits, néanmoins, une hypothèse présentée par la **Figure 11** suggère que ces lymphocytes régulateurs pourraient séquestrer les protéines B7 des APCs, ou les internaliser, empêchant ainsi toute interaction avec les récepteurs CD28 des lymphocytes effecteurs et donc leur activation [20].

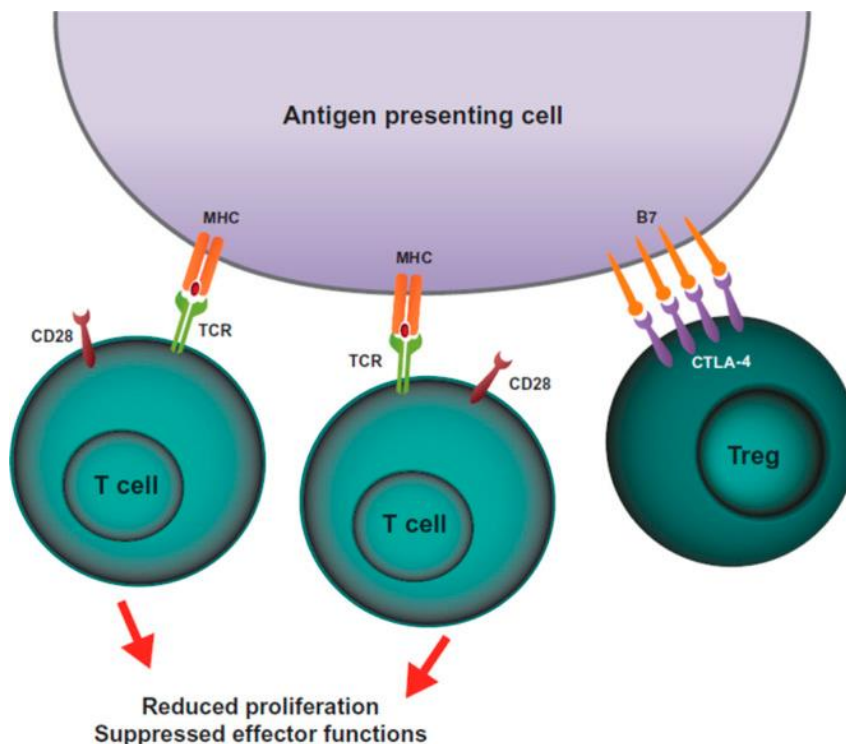


Figure 11 : Rôle de CTLA-4 exprimé par les lymphocytes T régulateurs selon Buchbinder et Desai [20]. Les lymphocytes T régulateurs recrutent la majorité des protéines B7 interdisant leur accès aux lymphocytes T effecteurs via CD28. S'en suit une anergie des

lymphocytes T provoquée par une absence de signaux co-stimulateurs en parallèle de l'interaction TCR-complexe CMH/antigène.

Enfin, CTLA-4 représente une cible de choix pour bloquer les mécanismes immunosuppresseurs permettant aux cancers de se développer. Ainsi, l'ipilimumab (**Figure 9**) est le premier anticorps anti-CTLA-4 approuvé aux Etats-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) et par l'Agence Européenne du Médicament contre le mélanome en 2011 en démontrant un prolongement significatif de la survie pour les patients traités lors des essais cliniques. D'autres essais sont en cours concernant les cancers du poumon, de la vessie et de la prostate.

1.4.2.2. PD1

La voie PD1 (Programmed Death 1, mort programmée 1) fonctionne sur le même principe que la voie CTLA-4. PD1 fait également partie des récepteurs des protéines de la famille B7, il est exprimé à la surface des lymphocytes T et joue le rôle de leur propre inhibiteur lorsqu'il entre en contact avec ses ligands PD-L1 et PD-L2. Cette interaction aboutit à l'inhibition de la prolifération cellulaire, à la diminution des émissions de cytokines et à la réduction de la survie cellulaire [20].

En revanche, des différences notoires existent entre ces 2 voies. Tout d'abord, contrairement à CTLA-4 qui n'est exprimé que par les lymphocytes T, PD1 se retrouve également sur les lymphocytes B et les cellules myéloïdes. De même, les ligands de CTLA-4 sont exprimés uniquement par les APCs, ce qui induit que l'inhibition des lymphocytes T *via* ce checkpoint se produit assez tôt durant la réaction immunitaire, au niveau des ganglions, pendant le contact entre les APCs et les lymphocytes, tandis que PD-L1 et PD-L2 sont exprimés par de nombreux types cellulaires, y compris par des cellules non leucocytaires. L'interaction entre les lymphocytes T et les cellules exprimant PD1 peut donc avoir lieu dans les tissus périphériques. A noter que PD-L1 est surexprimé en présence de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ et qu'il est retrouvé chez certaines cellules tumorales, ce qui en fait un facteur de mauvais pronostic et une cible pour empêcher l'inhibition des lymphocytes cytotoxiques, comme le suggère la **Figure 12**. Au contraire, PD-L2 est principalement exprimé par les cellules dendritiques et les monocytes et l'interaction PD1/PD-L2 conduit à une augmentation de l'activité des lymphocytes T helper de type 2 ayant un rôle plutôt pro-tumoral mais tout de même dépendant du contexte. En outre,

l'inhibition des lymphocytes T *via* PD1 est donc principalement périphérique contrairement à CTLA-4, et donc intervient plus tardivement [20, 24, 25].

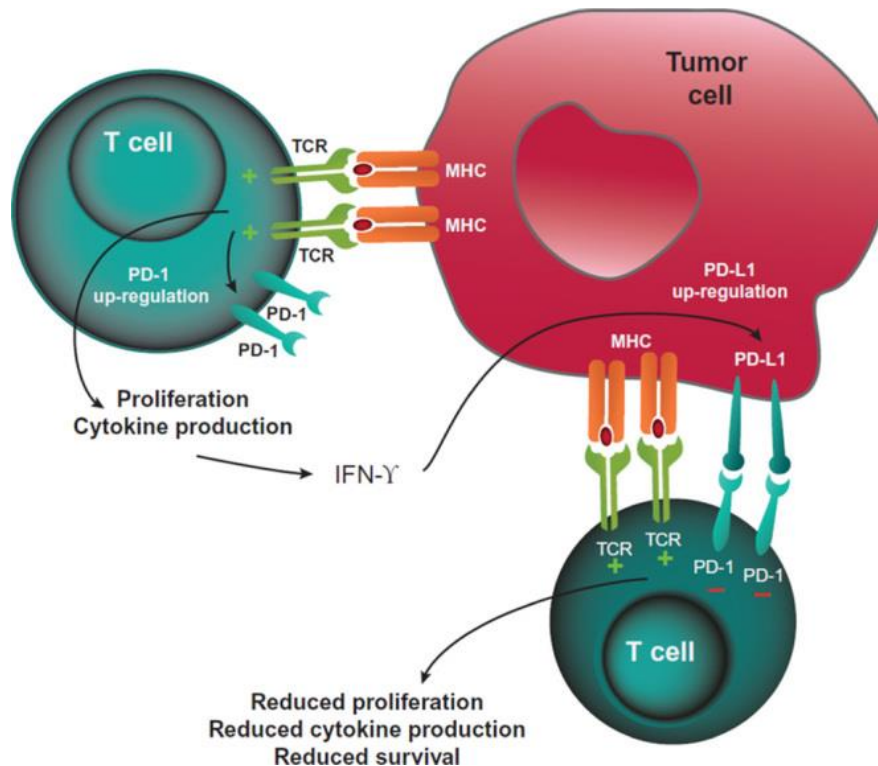


Figure 12 : Rôle de PD1 dans l'inhibition des lymphocytes T selon Buchbinder et Desai [20]. *En haut : la reconnaissance des antigènes tumoraux par les lymphocytes T conduit à la mise en place d'une réaction immunitaire, notamment via émission de cytokines telles que l'IFN- γ . En bas : L'environnement anti-tumoral engendré induit chez certains cancers une surexpression de PD-L1 permettant de renverser la balance en contrant le signal du TCR au moment de la reconnaissance de l'antigène.*

Enfin, les tous premiers résultats de thérapies anti-PD1 ont été bien plus encourageants que ceux obtenus avec CTLA-4, si bien que de nombreuses recherches ont été et sont effectuées concernant cette voie. Le nivolumab est le premier anticorps anti-PD1 approuvé contre le mélanome en 2014 au Japon et aux Etats Unis et en 2015 en Europe. En mars et novembre 2015, la FDA approuve également ce médicament respectivement contre le cancer du poumon non à petites cellules et le carcinome rénal en seconde ligne de traitement [15, 16, 20].

1.4.3. Toxicité

Ainsi, comme l'indique le **Tableau 1** ci-dessous, de nombreux essais cliniques sont réalisés concernant une multitude de checkpoints, ce qui reflète l'intérêt pour ces nouveaux traitements, même si les recherches sont surtout centralisées sur CTLA-4, PD1 et PD-L1. Plusieurs essais ciblant ces 3 molécules ont ainsi déjà été réalisés dans plusieurs indications. Malgré le bénéfice certain apporté aux patients, des effets indésirables non négligeables ont été relevés. En effet, l'emploi de thérapies ciblant les checkpoints immunitaires augmente le risque d'apparition d'effets secondaires liés à l'immunité (IrAEs en anglais pour immune-related adverse events) engendrés par la suractivation des lymphocytes T cytotoxiques ou à l'inhibition des lymphocytes T régulateurs, entraînant des réactions inflammatoires ou auto-immunes pouvant être mortelles et aboutissant à l'arrêt des traitements. Les symptômes fréquemment observés sont : diarrhée, prurit, rougeurs, inflammations touchant de nombreux organes tels que le colon, les poumons, le foie, les reins, les yeux, le système nerveux, etc. [20, 26, 27].

Les profils de toxicité diffèrent selon le traitement administré et de manière dose-dépendante [26]. Ainsi, la fréquence de ces effets indésirables de grade 3 (sévère) ou 4 (très sévère) est généralement plus importante pour les anticorps ciblant CTLA-4 que PD1. Par exemple, dans un essai clinique de phase 3, il a été reporté que l'ipilimumab a provoqué ce type de réaction chez 20% des patients, tandis que le taux d'apparition atteint 10 à 13% pour le pembrolizumab (qui cible PD1). Par ailleurs, d'après les premiers résultats d'essais de phases 1/2, il semble que les traitements anti-PD-L1 sont moins toxiques que les traitements anti-PD1 [20, 28].

Tableau 1 : Quelques essais cliniques ciblant les checkpoints immunitaires en 2014 d'après Sharon *et al.* [16].

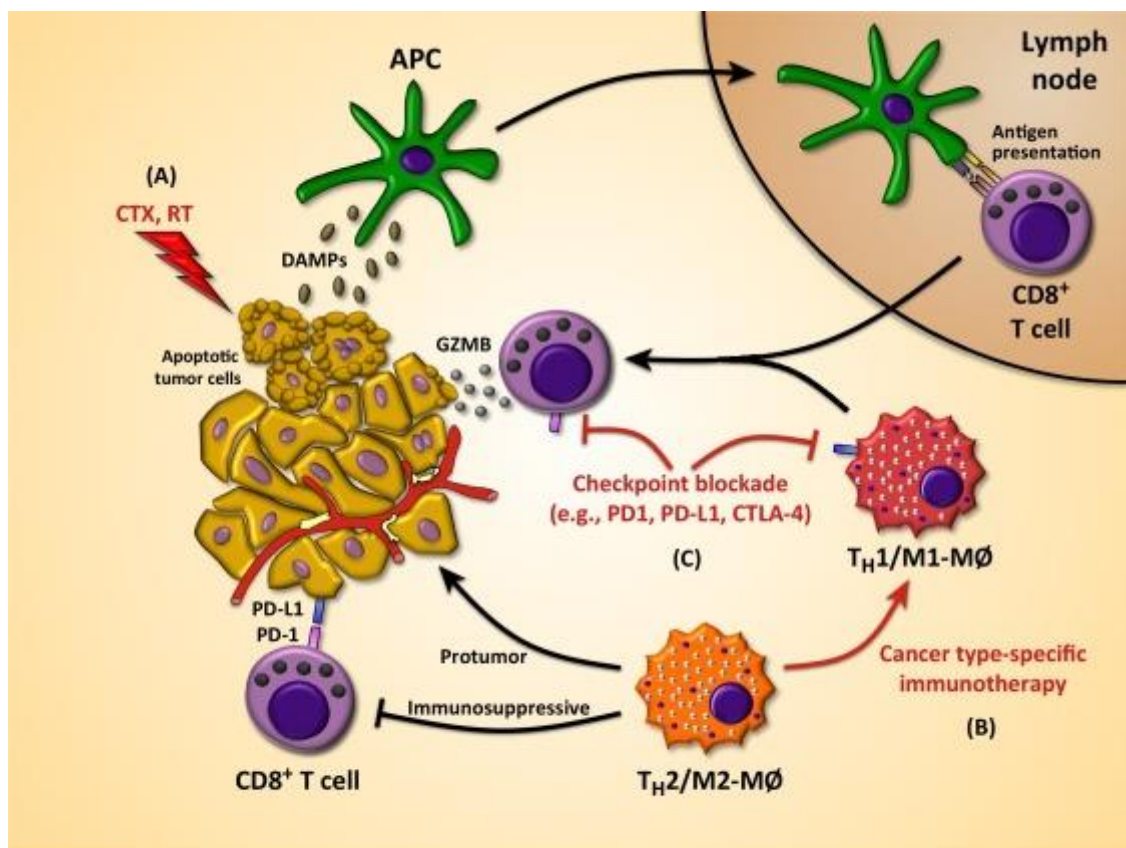
Target	Name	Indication(s)	Company	Phase	Clinical Trials.gov identifier (selected trials)
B7.1	Galiximab	Lymphoma	Biogen Idec	Phase II	NCT00516217
B7H3	MGA271	Solid tumors	Macrogenics	Phase I	NCT01391143
LAG3	IMP321	Solid tumors	Immunetep	Phase I/II	NCT00349934
	BMS-986016	Solid tumors	Bristol-Myers Squibb	Phase I	NCT01968109
CD137	BMS-663513	Solid tumors	Bristol-Myers Squibb	Phase I/II	NCT00309023
	PF-05082566	Lymphoma	Pfizer	Phase I	NCT01307267
KIR	IPH2101	Myeloma, AML	Innate Pharma (BMS)	Phase II	NCT01248455
					NCT01256073
CCR4	KW-0761	ATL, CTCL	Kyowa Kirin	Phase I/II	NCT00920790
CD27	CDX-1127	Solid tumors & Heme	CellDex Therapeutics	Phase I	NCT01460134
Ox40	MEDI-6469	Solid tumors	MedImmune/AZ	Phase I	NCT02205333
CD40	CP-870,893	Pancreatic	Genentech	Phase I	NCT01456585

1.4.4. Combinaisons

Comme décrit précédemment, les traitements bloquant les checkpoints immunitaires aboutissent, lorsqu'ils sont efficaces, à un bénéfice long et durable très encourageant. Toutefois, chez certains patients, la réponse au traitement n'est pas aussi bonne qu'escomptée et les tumeurs parviennent à se développer. Bloquer plusieurs checkpoints immunitaires par une combinaison d'anticorps pourrait éventuellement dépasser ces résistances par un effet synergique. Des études précliniques ont démontré de tels effets par l'inhibition simultanée de CTLA-4 et PD1 ou PD-L1 en comparaison avec les monothérapies. Par la suite, des résultats probants ont été observés chez des patients : dans un essai clinique de phase 3 portant sur l'efficacité comparée de l'ipilimumab seul et de la combinaison avec le nivolumab chez des patients atteints de mélanome métastatique, les taux de réponse s'élevaient respectivement à 19 et 58% et la médiane de survie sans progression atteignait 2,9 et 11,5 mois. Ces données encourageantes sont toutefois contrebalancées par une augmentation des effets indésirables : chez des patients atteints de mélanome ou de cancer pulmonaire à petites cellules, l'incidence des effets secondaires de grade 3 ou 4 était de 54,5%, 25,5% et 15,5% respectivement pour les patients traités avec la combinaison ipilimumab/nivolumab, l'ipilimumab seul et le nivolumab seul [20]. Par ailleurs, les combinaisons séquentielles semblent être moins toxiques et plus efficaces que les combinaisons simultanées, notamment chez les patients qui ont répondu

temporairement à un certain anticorps et pour lesquels un autre traitement ciblant un second checkpoint immunitaire a été administré suite à l'apparition d'une résistance [10, 20].

De la même manière, des combinaisons avec des chimiothérapies, des thérapies ciblées et des protocoles de radiothérapie sont étudiées. En effet, ces traitements, en détruisant des cellules tumorales, permettent la libération d'antigènes cytoplasmiques rendant la tumeur plus immunogène. Par la suite, si les cellules tumorales survivantes ne sont pas éliminées naturellement par le système immunitaire, l'association avec un traitement visant les checkpoints immunitaires peut renforcer la réponse. Cette stratégie est décrite dans la **Figure 13**. Tout comme les combinaisons d'ICI (Inhibiteur de Checkpoint Immunitaire), l'augmentation de l'efficacité liée à ce type d'association va généralement de paire avec une augmentation de la toxicité, suggérant l'importance d'optimiser les doses et schémas de traitement [10, 20].



Trends in Cancer

Figure 13 : Stratégie de combinaison radiothérapie/immunothérapie d'après Medler *et al.* [29]. A : Les cellules en apoptose libèrent des protéines de stress (DAMPs, Damage associated molecular pattern molecules, motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires) dans le stroma suite à une chimiothérapie (CTX) et/ou une radiothérapie (RT). Ces protéines

sont des antigènes que les cellules présentatrices d'antigènes (APC) captent, permettant ainsi leur maturation et leur migration dans le ganglion drainant la tumeur afin d'activer massivement les lymphocytes T CD8+. B : en bas, lignes noires, les lymphocytes activés et ayant migré en nombre au niveau de la tumeur sont rendus tolérants par un microenvironnement immunosuppresseur entretenu par des phénotypes de populations cellulaires immunitaires pro tumorales (Macrophages M2, Lymphocytes T helper 2 et/ou par l'expression de PD-L1 par la tumeur. A droite, lignes rouges, un traitement visant les checkpoints immunitaires permet d'empêcher cette conversion et maintient le pouvoir cytotoxique (via le granzyme B (GZMB)) des lymphocytes T activés par le traitement initial.

1.5. Objectifs

Oncodesign est une entreprise privée qui n'a pas vocation à faire de la recherche fondamentale. Comme indiqué précédemment, son but est de proposer à ses clients les meilleurs outils permettant de prédire l'efficacité de leur molécule anticancéreuse en l'intégrant dans un modèle animal pertinent. A ce titre, et considérant l'intérêt majeur et grandissant pour les immunothérapies ciblant les checkpoints immunitaires, il semblait nécessaire de caractériser un certain nombre de paramètres dans quelques modèles parmi les plus étudiés et traités avec ces nouvelles thérapies. En effet, dans un contexte commercial, il est intéressant de pouvoir exposer aux clients des données issues d'Oncodesign afin de leur démontrer un savoir-faire et leur proposer des solutions concrètes, notamment en ce qui concerne les combinaisons avec l'un de ces inhibiteurs de checkpoints immunitaires pour mettre en valeur la substance testée.

De ce fait, l'objectif de ce projet est de caractériser la réponse immunitaire au sein de 3 modèles animaux de cancer traités avec des anticorps inhibiteurs des voies CTLA-4 et PD1, les 2 checkpoints immunitaires les plus étudiés. Les 3 modèles choisis sont des modèles syngéniques qui permettent d'étudier le système immunitaire : EMT-6, 4T1 et CT26. En effet, plusieurs travaux in vivo ont déjà été réalisés sur ces lignées tumorales, mettant en évidence une efficacité plus ou moins importante de ce type de traitement, suggérant des réponses immunitaires différentes [30, 31, 32, 33]. Ainsi, la caractérisation de ces réponses pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu pour adapter les traitements selon l'avancement de la réponse immunitaire.

2. Matériels et méthodes

2.1. Lignées cellulaires tumorales et conditions de culture

2.1.1. Lignées cellulaires tumorales

Les lignées cellulaires utilisées dans cette étude sont détaillées dans le **Tableau 2** ci-dessous.

Tableau 2 : Détail des lignées cellulaires employées dans cette étude.

Lignée cellulaire	Type	Espèce	Origine
CT26	Adénocarcinome du colon	souris	ATCC
4T1	Carcinome mammaire	souris	ATCC
EMT-6	Carcinome mammaire	souris	ATCC

La lignée CT26 est à l'origine dérivée de cellules de carcinome indifférencié induit par traitement au N-nitroso-N-méthyluréthane (NNMU) chez des souris BALB/c.

La lignée EMT-6 est issue d'un clone isolé de la lignée EMT, elle-même obtenue après plusieurs passages d'une tumeur mammaire spontanée de souris BALB/c CGRL.

4T1 est une lignée résistante à la 6-thioguanine sélectionnée à partir de la lignée 410.4 sans traitement mutagène. Lorsque ces cellules sont injectées orthotopiquement sur des souris BALB/c, les masses produites ont un fort pouvoir disséminant et des métastases peuvent être retrouvées au niveau des poumons, du foie, des ganglions et du cerveau notamment [34].

Chacune de ces lignées présente un niveau de sécurité biologique de niveau 1 et nécessite donc de prendre les précautions minimales pour leur manipulation vis-à-vis de la protection du manipulateur (EPI de base : gants, lunettes, blouse).

2.1.2. Conditions de culture

Les cellules tumorales sont cultivées en monocouche, à 37°C et sous atmosphère contrôlée, constituée à 95% d'air et à 5% de CO₂. Le milieu de culture est composé de RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contenant de la L-glutamine à 2mM (réf : BE12-

702F, Lonza, Verviers, Belgique) et supplémenté en sérum de veau fœtal à hauteur de 10% (réf : 3302, PAN, Aidenbach, Allemagne). Concernant la lignée 4T1, le milieu de culture est également supplémenté avec 10mM d'HEPES (réf : BE17-737E, Lonza), 4,5g/L de glucose et 1mM de pyruvate de sodium (BE13-115E, Lonza), conformément aux préconisations du fournisseur. Les cellules sont adhérentes à la flasque. La quantité de cellules nécessaire à chaque expérience est obtenue par des passages successifs lorsque la confluence est atteinte (70 à 90% de confluence attendus).

Pour les passages et l'injection des cellules *in vivo*, les cellules tumorales sont décrochées des flasques de culture et remises en suspension après un traitement de 5 min environ à la trypsine-Versene® (réf : BE17-161E, Lonza) en milieu de Hanks exempt de calcium et magnésium (réf : BE10-543F, Lonza) et à 37°C. Les cellules sont observées continuellement et le traitement est neutralisé par ajout de milieu de culture complet en excès lorsque les cellules commencent à s'arrondir. Elles sont alors comptées à l'aide d'un hémocytomètre et la viabilité est évaluée par ajout de bleu trypan à 0,25% (réf : 17-942E, Cambrex, Emerainville, France). Les cultures cellulaires sont enfin testées pour la détection de mycoplasmes et un culot de cellules est congelé pour chaque expérience en vue d'une analyse d'assurance qualité permettant de vérifier la conformité des cellules cultivées par analyse génétique. L'**Annexe 1** décrit de manière plus précise les différentes étapes de la culture cellulaire.

2.2. Emploi d'animaux

2.2.1. Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris femelles BALB/c ByJ âgées de 7 semaines et fournies par l'élevage Charles River (L'Arbresles, France). Elles sont maintenues en statut sanitaire EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) tel que décrit dans les recommandations FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). L'hébergement des animaux et les procédures expérimentales sont réalisées en accord avec les réglementations françaises et européennes et en suivant le guide NRC (National Research Council) pour le traitement et l'utilisation des animaux de laboratoire [35, 36].

L'animalerie d'Oncodesign est agréée par les autorités françaises pour l'hébergement et l'utilisation d'animaux de laboratoire (Agrément n°B 21 231 011 EA) et est accréditée

AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International). Tous les protocoles expérimentaux sont soumis pour acceptation au comité d'éthique d'Oncodesign (OnComEt) agréé par les autorités françaises (Agrément CNREEA n°91).

Les animaux sont identifiés par insertion sous cutanée de puces RFID (réf : 10268, Biolog-ID, Bernay, France) et hébergés dans des cages étiquetées spécifiquement et individuellement.

2.2.2. Conditions d'hébergement

Les animaux sont maintenus dans une zone EOPS (Oncodesign, Dijon, France) dont les conditions environnementales sont rigoureusement contrôlées :

- Température : $22 \pm 2^\circ\text{C}$
- Hygrométrie : $55 \pm 10\%$
- Eclairage de cycle nyctémère 12h/12h
- Air filtré HEPA
- 15 renouvellements d'air par heure sans recirculation
- Surpression de $20 \pm 4 \text{ Pa}$

De plus, afin d'éviter de véhiculer des micro-organismes provenant de l'extérieur de l'animalerie, chaque personne qui entre dans cette zone doit respecter des consignes d'hygiène strictes (douche, vêtements et protections stériles). De même, le matériel nécessaire aux manipulations est préalablement stérilisé par autoclavage ou par désinfection au peroxyde d'hydrogène.

L'animalerie fournit aux animaux un espace d'hébergement convenable et stérile avec litière, nourriture, eau et enrichissement comme décrit ci-dessous :

- Cages à couvercle filtrant en polycarbonate Eurostandard type 3 ou 4 (Techniplast, Limonest, France) pouvant accueillir 10 souris par cage
- Litière à base de rafle de maïs (réf : LAB COB 12, SERLAB, Cergy-Pontoise, France) renouvelée 2 fois par semaine
- Aliment complet pour rongeurs immunocompétents irradié à 25kGy (Ssniff® Soest, Allemagne) fourni *ad libitum*
- Eau stérilisée par filtration à $0,2 \mu\text{m}$ et fournie *ad libitum*

- Enrichissement environnemental (Sizzle-dri kraft, SERLAB)

2.2.3. Monitoring

Toutes les données de l'étude, incluant les mesures effectuées sur les animaux, les enregistrements de mortalité et les traitements sont programmés et enregistrés sur une base de données sécurisée *via* le logiciel Vivo Manager® (Biosystemes, Dijon, France).

La viabilité et le comportement des animaux, la présence d'eau et de nourriture sont observés et enregistrés quotidiennement. Le poids des souris et le volume des tumeurs sont mesurés 2 ou 3 fois par semaine. Le volume tumoral est calculé grâce aux mesures effectuées au pied à coulisse électronique selon la formule suivante :

$$\text{Volume tumoral} = \frac{\text{Largeur}^2 \times \text{Longueur}}{2}$$

2.2.4. Points limites

Tout animal faisant partie de ce projet et ayant atteint un ou plusieurs des points limites suivants doit être euthanasié sous 24h.

- Signes de douleur, souffrance ou détresse (posture, masque facial, comportement)
- Tumeur représentant plus de 10% du poids de l'animal sans excéder 1500mm³
- Tumeur gênant la mobilité et/ou la nutrition
- 20% de perte de poids pendant 3 jours consécutifs
- Mauvaise condition physique, amaigrissement, cachexie, déshydratation
- Absence prolongée de réponse volontaire à des stimuli externes
- Respiration difficile, anémie, saignement important
- Signes neurologiques : paralysie, convulsions, pertes d'équilibre
- Hypothermie
- Distension abdominale

Une demande exceptionnelle et justifiée de dépassement des critères éthiques peut être soumise à OnComEt qui se réserve le droit de l'accepter ou non et sous quelles conditions.

2.2.5. Procédures

Avant toute manipulation, les animaux sont observés pendant au moins 7 jours après leur arrivée afin de contrôler leur état et de leur permettre de se remettre du transport.

Les procédures chirurgicales sont décrites dans des modes opératoires approuvés par IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee).

Pour toutes les procédures qui nécessitent d'endormir les animaux, l'anesthésie gazeuse par l'isoflurane (Minerve, Bondoufle, France) est pratiquée systématiquement.

L'euthanasie des animaux est réalisée par un surdosage d'anesthésie gazeuse (isoflurane) suivi d'une dislocation cervicale ou d'une exsanguination. Les méthodes d'euthanasie employées à Oncodesign sont recommandées pour les souris et les rats selon la directive européenne 2010/63/CE, approuvées par IACUC et mises en œuvre par des techniciens formés et compétents.

2.3. Produits de traitement

Tous les produits de traitements sont stockés et gérés par le CRBC (Centre de Ressources Biologiques et Chimiques d'Oncodesign). Ils sont préparés et transmis extemporanément au laboratoire Vivo pour leur administration.

Tous les traitements administrés dans cette étude sont des solutions d'anticorps monoclonaux fournis par Bioxcell (West Lebanon, Etats-Unis). Tous ces anticorps sont administrés à une dose de 10mg/kg dans un volume d'administration de 10mL/kg. Ils sont dilués en PBS (Lonza) selon le titrage de la solution mère pour atteindre une concentration finale de 1mg/mL. La sélection des clones d'intérêts a été réalisée dans la plupart des cas en fonction des données extraites de la littérature, comme précisé dans la liste ci-dessous.

- Anti-4-1BB (agoniste), clone 3H3 (réf : BE0239) [31]
- Anti-CTLA4, clone 9H10 (réf : BE0131) [30]
- Anti-CTLA4, clone 9D9 (réf : BE0164)
- Anti-GITR, clone DTA-1 (réf : BE0063) [31, 33]
- Anti-OX40 (agoniste), clone OX-86 (réf : BE0031) [31]
- Anti-PD1, clone RMP1-14 (réf : BE0146) [31, 33]
- Anti-PD-L1, clone 10F.9G2 (réf : BE0101)

Les anticorps dits agonistes activent la cible une fois qu'ils s'y sont fixés contrairement aux autres anticorps qui la bloquent. Les anticorps agonistes ciblent donc des checkpoints immunitaires activateurs des lymphocytes T.

Toutes les solutions sont limpides, stables, et ne précipitent pas. Les solutions mères sont stockées dans le noir à 4°C. Les solutions de traitements sont préparées dans des tubes à essai en verre étiquetés individuellement et maintenues à température ambiante jusqu'à leur administration.

2.4. Design expérimental et traitements

2.4.1. Inductions tumorales

Les tumeurs EMT-6 sont induites par injection sous cutanée de 1×10^6 cellules en suspension dans 200 μ L de RPMI 1640 au niveau du flanc droit de souris BALB/c femelles préalablement rasées.

Les tumeurs 4T1 sont induites par injection orthotopique de 1×10^5 cellules en suspension dans 50 μ L de RPMI 1640 dans la graisse mammaire, au niveau de la mamelle R2 indiquée sur la **Figure 14**, chez des souris BALB/c femelles préalablement rasées. Pour cela, après désinfection de la peau, une petite incision de 5mm est réalisée sous la mamelle pour exposer la graisse mammaire. La suspension est injectée avec une seringue à insuline dans le tissu graisseux en évitant tout contact avec l'espace sous cutané. Après injection des cellules, la seringue est retirée et une compresse stérile imbibée d'éthanol à 70% est appliquée afin d'éliminer les cellules tumorales qui auraient pu fuir du site d'injection. La peau est enfin recousue avec un fil non résorbable en nylon 4-0 (réf : Crinerce 4.0 SN515, Covidien, Elancourt, France). La gravité du geste chirurgical est jugée légère et la douleur est donc prise en charge par une injection unique, sous cutanée dans la zone interscapulaire, d'une solution de carprofène injectable (Rimadyl®, Zoetis, Malakoff, France) à une dose de 5mg/kg, 5mL/kg, après anesthésie et avant l'incision.

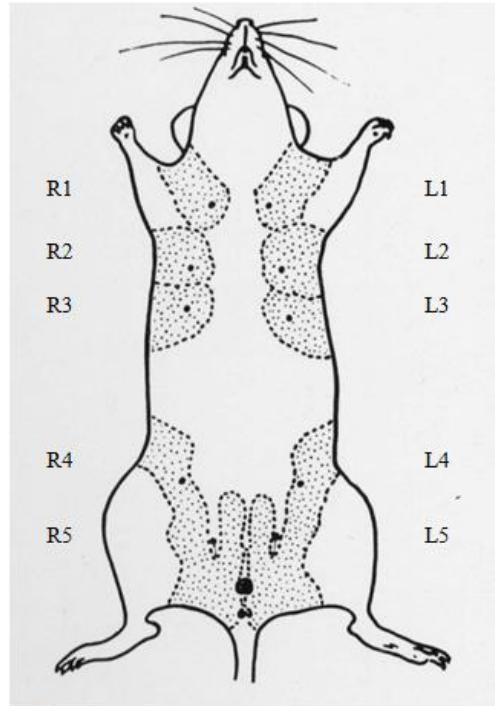


Figure 14 : Distribution des glandes mammaires chez la souris selon Green *et al.* [37]. R = right, droit ; L=left, gauche.

Les tumeurs CT26 sont induites par injection sous cutanée de 1×10^6 cellules en suspension dans 200 μ L de RPMI 1640 au niveau du flanc droit de souris BALB/c femelles préalablement rasées.

Le jour de l'induction tumorale est considéré comme D0 (Day 0, Jour 0).

2.4.2. Schéma de traitement

Lorsque le volume tumoral atteint en moyenne 50 à 200mm³ et que les tumeurs sont bien en croissance, les souris de chaque modèle sont réparties dans les groupes de traitement selon leur volume tumoral individuel. Un test statistique (analyse de variance) est réalisé pour vérifier l'homogénéité du volume tumoral entre les groupes. Le poids des animaux est également pris en compte dans la distribution, de sorte qu'il n'y ait pas plus d'un demi-gramme d'écart entre les moyennes extrêmes. Le schéma de traitement pour tous les modèles est décrit ci-dessous et résumé dans le **Tableau 3** :

- Les 10 animaux du groupe contrôle recevront 2 injections intra-péritonéales (IP) de véhicule pendant 2 semaines (TWx2, Twice weekly x2 = 2 fois par semaine x2, soit 4 traitements).

- Les 10 animaux des groupes traités avec les anticorps recevront 2 injections IP d'anticorps par semaine (Lundi/jeudi ou mardi/vendredi) pendant 2 semaines (soit 4 traitements) à 10mg/kg par injection (TWx2)
- Les 10 animaux traités à l'anticorps anti-PD-L1 recevront 8 injections IP à 10mg/kg par injection tous les 2 jours (Q2Dx8).

Tableau 3 : Schémas de traitement des anticorps inhibiteurs de checkpoints immunitaires. *ICI = Inhibiteur de Checkpoint Immunitaire.*

Groupe	Effectif	Dose (mg/kg/inj)	Voie d'administration	Schéma de traitement
Contrôle	10	-	IP	TWx2
ICI	10	10	IP	TWx2
Anti-PD-L1	10	10	IP	Q2Dx8

2.4.3. Prélèvements

Lorsque les premières souris atteignent les critères éthiques d'euthanasie, soit environ 1500 mm³, toutes les souris du même modèle sont euthanasiées. Pour chaque modèle, différents prélèvements sont effectués comme décrit ci-dessous.

2.4.3.1. Prélèvements pour analyse histologique

La tumeur est prélevée, pesée entière et une partie est fixée 24 à 48h en formol (Réf : FOR0060AF59001, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) avant d'être découpée en tranches de 4mm d'épaisseur et placée en cassette d'inclusion.

Les ganglions sentinelles, c'est à dire les ganglions axillaires et inguinaux droits qui drainent la tumeur, visibles sur la **Figure 15**, sont prélevés, pesés ensemble et une partie est fixée 24 à 48h en formol avant d'être placée en cassette d'inclusion.

La rate est également prélevée, pesée et fixée entière 24 à 48h en formol avant d'être placée en cassette d'inclusion.

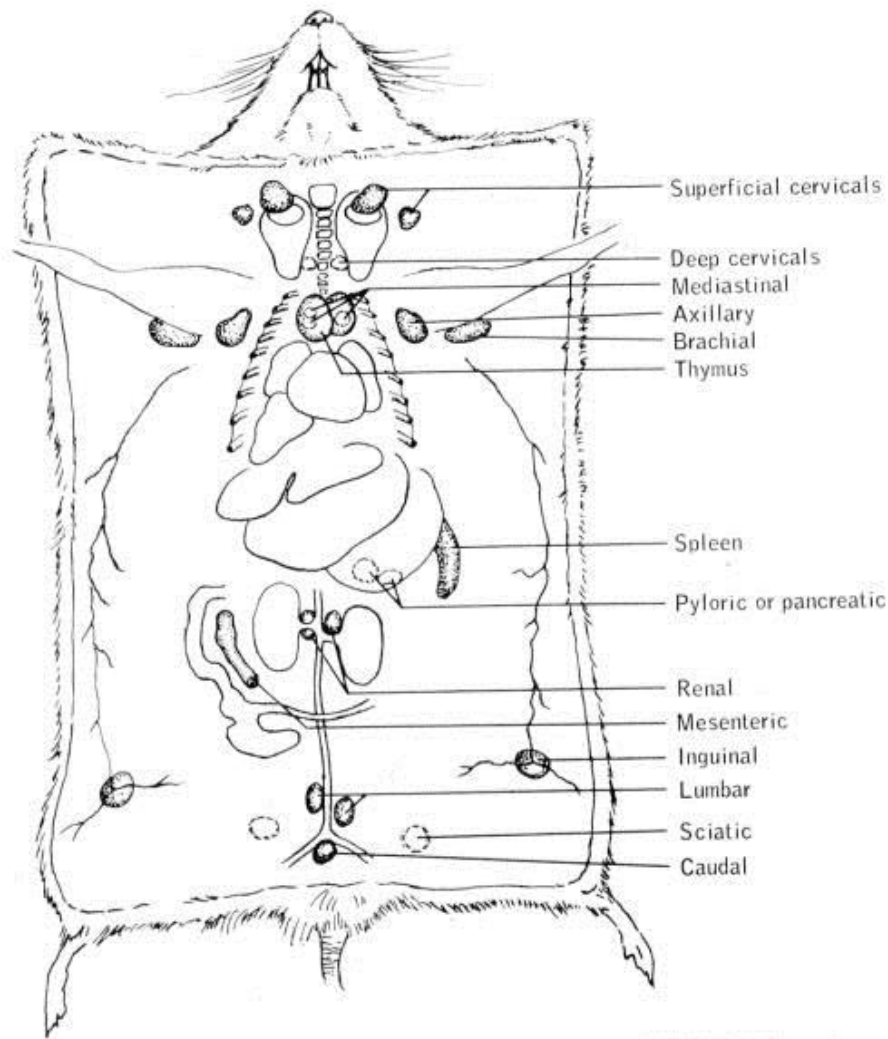


Figure 15 : Distribution des ganglions chez la souris selon Green *et al.* [37].

Concernant le modèle 4T1 et notamment son pouvoir métastasant, les poumons des souris porteuses de cette tumeur sont prélevés et pesés. Une évaluation macroscopique du nombre de métastases est effectuée immédiatement par un comptage des lésions blanches visibles à la surface de chaque lobe des poumons. Ce comptage est réalisé consécutivement par 2 techniciens en aveugle. Ils sont ensuite fixés 24 à 48h en formol avant d'être placés en cassette d'inclusion.

Les échantillons ainsi fixés et en cassettes subiront un cycle de déshydratation tel que décrit dans le **Tableau 4**, dans un automate d'inclusion de type carrousel (réf : Leica TP1020, Leicabiosystems, Nanterre, France), et suivie d'une inclusion en paraffine (réf : Paraplast, Leicabiosystems).

Tableau 4 : Cycle de déshydratation des tissus avant enrobage en paraffine.

Bain	Temps d'incubation
Ethanol 70%	30 min
Ethanol 80%	30 min
Ethanol 80%	30 min
Ethanol 95%	30 min
Ethanol 95%	30 min
Ethanol 100%	1h
Ethanol 100%	2h
Xylène	1h
Xylène	1h30
Xylène	2h
Paraffine	1h30
Paraffine	2h30

Les colorations Hématoxyline-Eosine (HE) sont effectuées conformément au protocole décrit en **Annexe 2**. La lecture des lames est réalisée par le Docteur Laurent Arnould, médecin anatomopathologiste et responsable du service de biologie et de pathologie des tumeurs au Centre Georges François Leclerc (CGFL, Dijon). Les scorings d'infiltrats immunitaires sont effectués au microscope par analyse de 5 champs au grossissement x200. Les lames (Superfrost plus, réf : 10149870, Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France) analysées portent des coupes de 5µm d'épaisseur réalisées au microtome avec les échantillons inclus en paraffine comme décrit ci-dessus. Les scores attribués vont de 0 (pas d'infiltrat immunitaire) à 3 (infiltrat immunitaire massif).

2.4.3.2. Prélèvements pour quantification des lymphocytes Treg et Teff

Une partie des tumeurs et des ganglions prélevés sont destinés à des analyses de cytométrie de flux (FACS, Fluorescence-activated cell sorting) pour quantification des populations de lymphocytes T régulateurs et effecteurs. Ces échantillons sont dissociés mécaniquement afin de récupérer une suspension cellulaire qui sera marquée par les anticorps décrits dans le **Tableau 5** en vue d'un dénombrement de ces 2 types cellulaires. Les marqueurs ciblés par ces anticorps et permettant d'isoler les 2 populations sont le CD45 et le CD3 pour les marqueurs communs des lymphocytes T. Le CD8 permet ensuite d'isoler les lymphocytes T effecteurs ou cytotoxiques tandis que les lymphocytes T régulateurs sont caractérisés par l'expression du CD4 (lymphocytes T helper) et du FoxP3 (lymphocytes T helper régulateurs). Le protocole précis des marquages membranaires (CD45, CD3, CD8, CD4) est décrit en **Annexe 3**. FoxP3 étant une protéine située principalement à l'intérieur du noyau cellulaire, son marquage nécessite un protocole particulier décrit en **Annexe 4** pour pouvoir l'atteindre.

Tableau 5 : Anticorps employés pour les quantifications des populations de lymphocytes T effecteurs et régulateurs.

Cible	Fluorochrome	Absorbance max (nm)	Emission max (nm)	Espèce ciblée	Espèce de production	Référence	Fournisseur
FoxP3	PE	496	578	Humain/souris	Souris	130-093-014	Miltenyi Biotec
CD8a	PerCP	482	678	Souris	Rat	553036	BD Biosciences
CD3	V450	404	448	Souris	Rat	561389	BD Biosciences
CD4	VioGreen	405	520	Souris	Rat	130-102-444	Miltenyi Biotec
CD45	APC-Cy7	650	785	Souris	Rat	557659	BD Biosciences

Les cellules marquées sont par la suite comptées à l'aide d'un cytomètre LSR II (BD Biosciences) mis à disposition sur la plateforme de cytométrie en flux au Plateau Technique de Biologie de Dijon par l'IFR100 Santé STIC. Les résultats sont analysés *via* le logiciel FlowJo[®] et la stratégie de gating (fenêtrage) permettant d'isoler informatiquement les populations cellulaires d'intérêt au sein de la masse de signal acquise est décrite dans la **Figure 16**. Les comptages récupérés permettent de déterminer notamment la proportion de lymphocytes T effecteurs par rapport aux T régulateurs (*ratio* Teff/Treg).

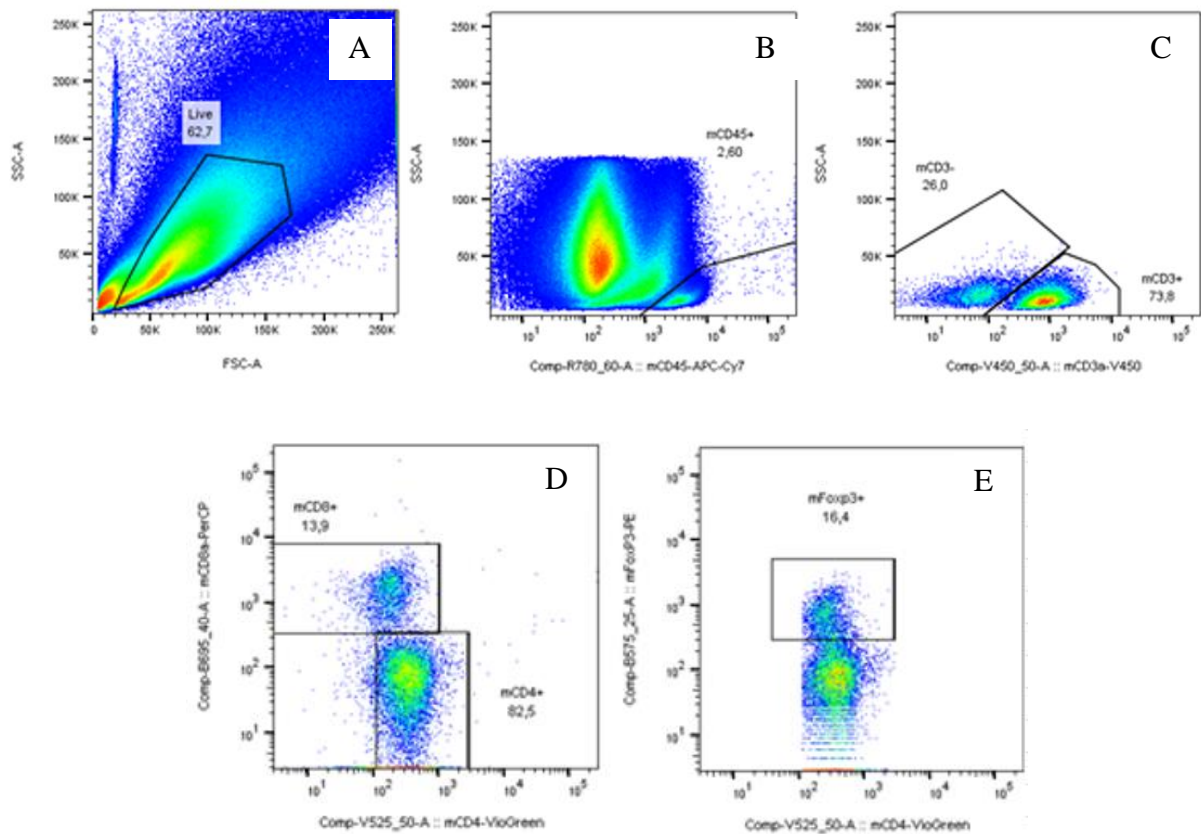


Figure 16 : Stratégie de gating pour quantification des populations de lymphocytes T effecteurs et régulateurs par cytométrie en flux. Chacun de ces graphiques représente le signal acquis en fonction de la dispersion lumineuse axiale (FSC, Forward Light Scatter), latérale (SSC, Side Light Scatter) et des différents fluorochromes fixés sur les cellules via les anticorps de marquage. Un évènement correspond à un point bleu. Plus il y a de points qui se chevauchent, plus la couleur de la zone en question tend vers le rouge. Les régions d'intérêts sont entourées par un trait noir et sont définies par le petit encadré sur le graphique tel que définit ci après. A : Sélection du signal correspondant aux cellules vivantes. B : Sélection des cellules exprimant le CD45 murin au sein des cellules vivantes (leucocytes). C : Sélection des cellules exprimant le CD3 murin au sein des leucocytes (lymphocytes T). D : Séparation des lymphocytes T effecteurs (CD8+) et helper (CD4+) au sein de la population de lymphocytes T isolée. E : Sélection des cellules exprimant le FoxP3 au sein des lymphocytes T helper (lymphocytes T régulateurs).

2.4.3.3. *Prélèvements pour dosages cytokiniques*

L'euthanasie est pratiquée par une ponction sanguine intracardiaque sous anesthésie profonde pour prélever le maximum de sang. Ce sang est ensuite placé en tubes activateurs de coagulation (réf : 20.1308, Sarstedt, Marnay, France) pendant 30 min à température ambiante puis centrifugé pendant 10 minutes à une vitesse de 2000G comme préconisé par le fournisseur. Le sérum résultant est alors récupéré en plusieurs aliquots, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'au dosage de cytokines circulantes.

Ces dosages sont effectués grâce à des kits (réf : MCYTOMAG-70K-PMX, Merk Millipore, Billerica, Etats-Unis) utilisant la technologie Luminex®. Ils permettent de doser simultanément, dans un même puits d'une plaque 96 puits, un panel de plusieurs cytokines et chimiokines *via* des analyses multiplexes à base de billes fluorescentes et de réactions immunologiques. Les cytokines dosées par ce kit sont répertoriées dans le **Tableau 6**. L'**Annexe 5** reprend le mode opératoire issu de la notice du kit permettant de réaliser les dosages conformément aux préconisations du fabricant. La lecture des plaques est sous traitée au Plateau Technique de Biologie de Dijon qui est doté, au sein de la plateforme de cytométrie, d'un lecteur Bioplex 200 (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France).

Tableau 6 : Dénominations des cytokines et chimiokines dosées.

Abréviation	Nom anglais complet
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1 α	Interleukine-1 alpha
IL-1 β	Interleukine-1 beta
IL-2	Interleukine-2
IL-4	Interleukine-4
IL-5	Interleukine-5
IL-6	Interleukine-6
IL-7	Interleukine-7
IL-9	Interleukine-9
IL-10	Interleukine-10
IL-12 (p40)	Interleukine-12
IL-12 (p70)	Interleukine-12
IL-13	Interleukine-13
IL-15	Interleukine-15
IL-17	Interleukine-17
IP-10	Interferon gamma-induced Protein-10 (CXCL10)
KC	Keratinocyte chemoattractant (CXCL1)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2)
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha (CCL3)
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein-1 beta (CCL4)
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2 (CXCL2)
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (CCL5)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha

2.4.4. Statistiques

Les différentes données ont été analysées statistiquement via un test de Tukey dans le logiciel GraphPad Prism[®]. Ce test de comparaisons multiples permet de déterminer les différences significatives entre les moyennes de groupes dans une analyse de variance.

3. Résultats et discussion

3.1. Evaluation de l'efficacité anti-tumorale d'anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD1

3.1.1. Activité anti-tumorale *in vivo*

L'activité anti-tumorale *in vivo* est évaluée grâce aux mesures de volume tumoral effectuées au pied à coulisse pour 3 modèles syngéniques : EMT-6, CT26 et 4T1. La **Figure 17** ci-dessous représente l'évolution de ce volume au cours du temps, pour chaque groupe et pour chaque modèle.

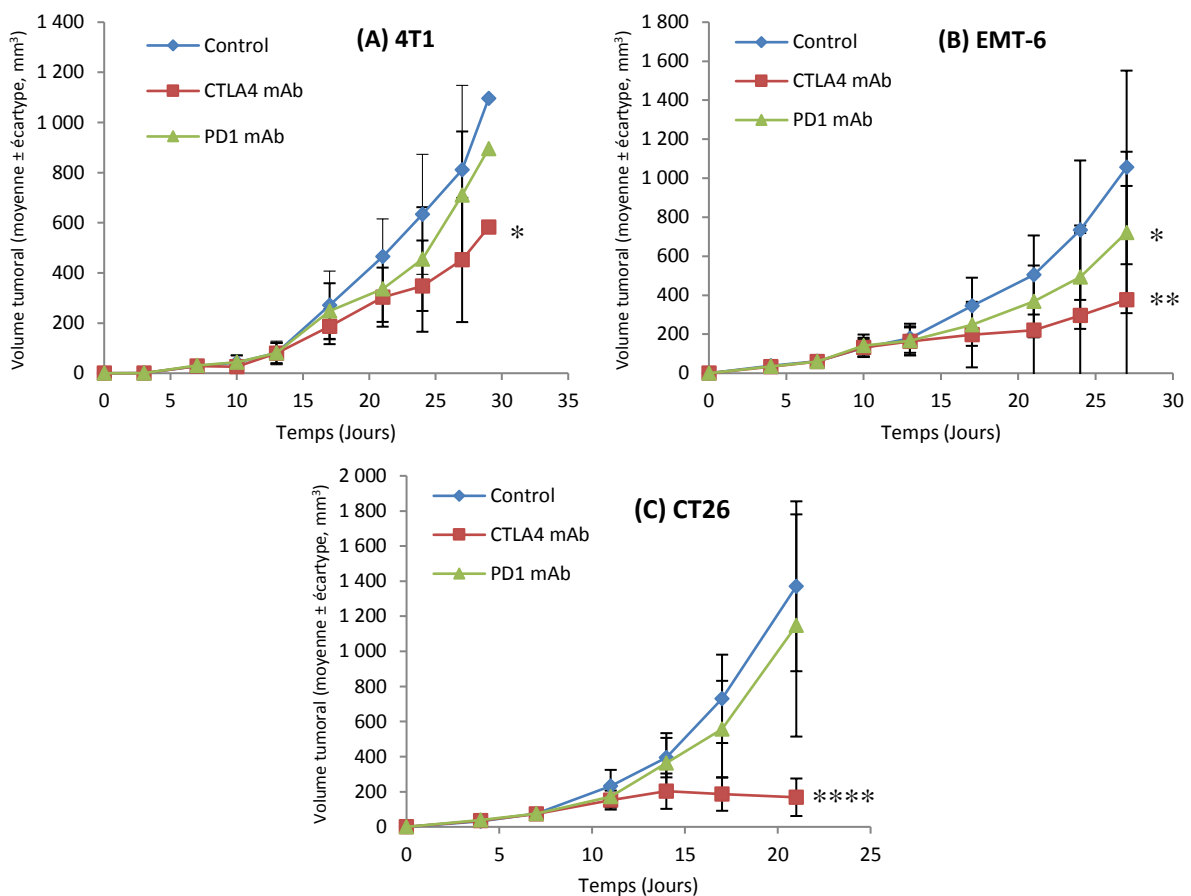


Figure 17 : Evolution de la croissance tumorale de trois modèles tumoraux *in vivo* (4T1 (A), EMT-6 (B) et CT26 (C)) traités avec deux ICI au cours du temps. Chaque point représente la moyenne des 10 souris du groupe le jour de la mesure et les barres d'erreur, l'écart type correspondant. (A) : pour 4T1, le premier traitement a eu lieu à D13 avec un volume tumoral moyen de 90, 80 et 80 pour les groupes contrôles, anti-CTLA-4 et anti-PD1, respectivement. (B) : pour EMT-6, le premier traitement a eu lieu à D7 avec un volume tumoral moyen de 62, 60 et 60 pour les groupes contrôle, anti-CTLA-4 et anti-PD1,

respectivement. (C) : pour CT26, le premier traitement a eu lieu à D7 avec un volume tumoral moyen de 75, 74 et 75 pour les groupes contrôle, anti-CTLA-4 et anti-PD1, respectivement. Pour chaque graphique, D0 représente l'injection des cellules tumorales. Les données ont été analysés statistiquement par un test de Tukey (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$ versus contrôle).

De manière générale, chaque anticorps présente une activité anti-tumorale qui se traduit par une diminution plus ou moins marquée de la croissance tumorale pour chacun des 3 modèles en comparaison aux groupes contrôles. Cependant, il doit être notifié que l'anticorps anti-PD1 a une activité significative uniquement pour le modèle EMT-6 tandis que l'anticorps anti-CTLA-4 présente une activité anti-tumorale beaucoup plus marquée avec un effet significatif pour chaque modèle. De plus, cet anticorps montre une régression tumorale dans le modèle CT26. Ces observations sont corroborées par les pesées des tumeurs dont les valeurs médianes sont récapitulées dans le **Tableau 7** au moment de l'euthanasie des animaux. Il doit être notifié que dans le modèle 4T1, bien que relativement faible, l'anticorps anti-CTLA4 montre un effet significatif visible ($p < 0,05$) sur la mesure du volume tumoral mais un effet marginal et non significatif sur la pesée des tumeurs en fin d'étude. Comme déjà observé à Oncodesign, ce modèle montre une résistance aux ICI testés. De la même manière, les modèles CT26 et EMT-6 sont conformes aux résultats historiquement obtenus aux ICI testés.

Tableau 7 : Poids médians des tumeurs pour chaque groupe et chaque modèle.
Les valeurs sont exprimées en grammes et les extrêmes sont indiquées entre crochets. Les médianes ont été calculées avec les valeurs individuelles des 10 animaux par groupe, sauf pour le modèle 4T1 pour lequel seulement 7 valeurs sont prises en compte dans le groupe traité à l'anti-CTLA-4 car 3 animaux sont décédés prématurément. Les données ont été analysés statistiquement par un test de Tukey ($p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$ versus contrôle).*

	4T1	CT26	EMT-6
Control	1,507 [0.984 ; 2.151]	2,885 [1.447 ; 5.062]	0,779 [0.168 ; 1.241]
CTLA-4 mab	1,370 [0.267 ; 1.584]	0,063**** [0.001 ; 0.324]	0,044* [0.000 ; 0.939]
PD1 mab	1,638 [0.791 ; 2.091]	2,465 [0.006 ; 4.367]	0,596 [0.000 ; 1.310]

Dans le cadre d'études précliniques, le *ratio* T/C, défini comme étant le rapport de la médiane du volume tumoral d'un groupe traité par la médiane du volume tumoral du groupe contrôle associé, est couramment employé pour évaluer de manière chiffrée l'efficacité de la substance administrée. Aussi, le NCI (National Cancer Institute, Etats-Unis) considère qu'un *ratio* T/C inférieur ou égal à 42% est associé à une activité anti-tumorale significative et qu'un *ratio* T/C inférieur à 10% est associé à une activité hautement significative. Les molécules entrant dans cette dernière catégorie sont, selon le NCI, éligibles pour un essai clinique [38]. C'est pourquoi les *ratios* T/C ont été calculés pour chaque molécule et chaque modèle et sont répertoriés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Ratios T/C par modèle et par anticorps. *Les valeurs sont exprimées en pourcentages. Chaque groupe possède un effectif de 10 animaux. Les médianes ont été calculées au dernier jour de mesure pour lequel tous les animaux étaient en vie, soit à D21, D27 et D21 pour les modèles 4T1, EMT-6 et CT26, respectivement.*

	T/C (%)		
	4T1 (D21)	EMT-6 (D27)	CT26 (D21)
G1 Control	100	100	100
G2 Anti-CTLA4	66	4	11
G3 Anti-PD1	68	63	95

D'après le **Tableau 8** et selon les critères du NCI, l'efficacité anti-tumorale de l'anticorps anti-CTLA-4 est confirmée avec un *ratio* de 4% pour EMT-6 à D27 et de 11% pour CT26 à D21. En revanche, aucune activité significative n'est observée pour le modèle 4T1. L'anticorps anti-PD1 ne présente qu'une efficacité modérée sur les modèles 4T1 et EMT-6 (68 et 63% à D21 et D27, respectivement) et une activité marginale sur le modèle CT26 (95% à D21).

Une analyse individuelle permet de plus de mettre en évidence une hétérogénéité dans les réponses aux traitements comme le montre la **Figure 18**. Bien que ces 3 modèles soient développés chez des souris BALB/c, lignée murine consanguine dont les membres sont extrêmement proches du point de vue génétique et évoluant dans un environnement

rigoureusement contrôlé, conduisant à une exposition restreinte et homogène des facteurs environnementaux, pouvant ainsi suggérer un développement similaire du système immunitaire entre les différents individus d'une même colonie, il semble que des différences de sensibilité existent entre ces animaux. A ce stade de la discussion, il doit être notifié que cette hétérogénéité de réponse après traitement avec des ICI est fréquente en clinique chez des patients.

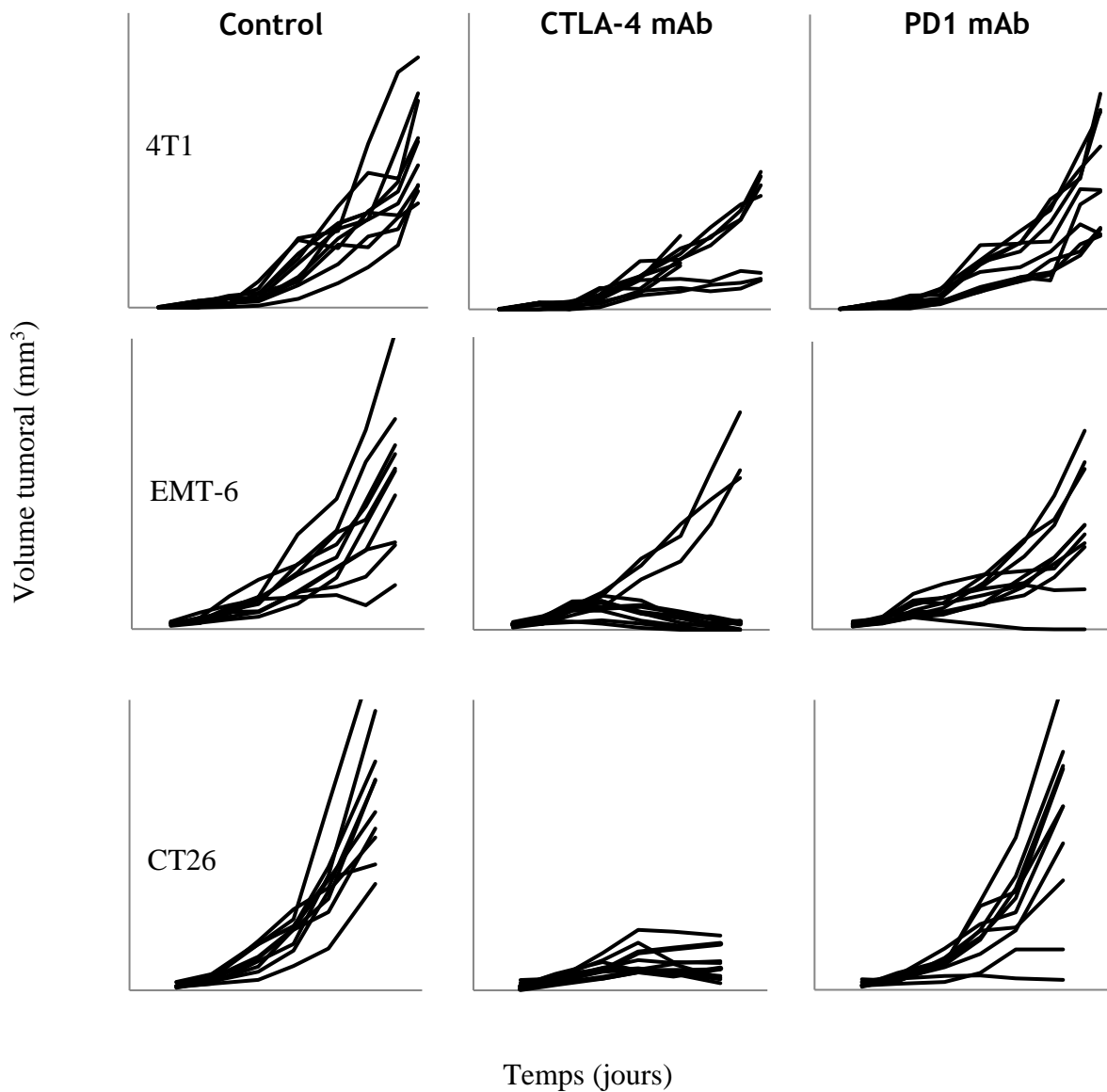


Figure 18 : Courbes individuelles de croissance tumorale pour chaque modèle et chaque groupe. Chaque graphique présente la croissance tumorale (en mm³) au cours du temps. Chaque courbe correspond à un animal.

En effet, pour chacun des 3 modèles, des sous populations peuvent être identifiées en fonction de leur réponse aux traitements. Pour l'anticorps anti-CTLA-4 qui a un effet significatif, cette distinction est flagrante, notamment pour les modèles 4T1 et EMT-6 pour lesquels un sous-groupe de souris répond très bien au traitement contrairement au reste des animaux. En revanche, pour le modèle CT26, tous les animaux répondent au traitement. Concernant l'anticorps anti-PD1, cette distinction est plus délicate mais l'on constate néanmoins une hétérogénéité très importante dans les croissances tumorales avec des animaux présentant une régression tumorale (modèles EMT-6 et CT26) et d'autres qui ne semblent pas du tout répondre au sein des mêmes groupes.

Contrairement à ce qui a pu être observé chez l'homme, un effet plus marqué est constaté pour l'anticorps anti-CTLA-4 alors que chez les patients, l'anticorps anti-PD1 montre de meilleurs résultats [20, 39]. Etant donné que les différentes populations immunitaires ne sont pas identiques qualitativement et quantitativement chez l'homme et la souris, il est évidemment délicat de comparer des données cliniques et précliniques d'un point de vue purement immunitaire. De plus, il doit être notifié que les anticorps employés dans ces expériences ne sont pas identiques à ceux employés en clinique. Néanmoins, ce type de thérapie démontre un effet marqué à la fois chez l'homme et chez l'animal, permettant de légitimer ces modèles animaux comme moyen d'étude préclinique de l'efficacité anti-tumorale d'ICI.

3.1.2. Incidence des traitements sur les métastases 4T1

4T1 est connu pour produire des métastases pulmonaires, notamment lorsque les cellules tumorales sont implantées proches de la cage thoracique comme c'est le cas ici (mamelle R2). Ainsi, la **Figure 19** ci-dessous présente le résultat des comptages individuels de métastases pulmonaires. Au niveau des groupes, les différents traitements induisent une diminution non significative du nombre de métastases pulmonaires comptées macroscopiquement. De plus, les 3 animaux traités à l'anticorps anti-CTLA-4 qui ont peu de métastases sont ceux qui présentent également la plus faible croissance tumorale primaire (**Figure 18**). De même, pour l'anticorps anti-PD1, les 2 animaux montrant l'invasion pulmonaire la moins forte sont parmi ceux présentant les tumeurs les plus petites.

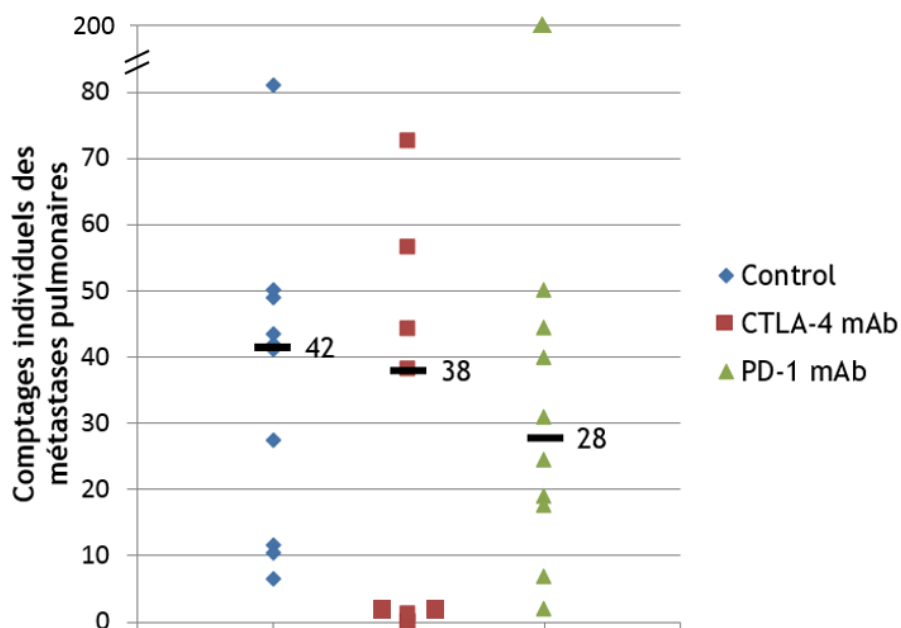


Figure 19 : Comptages macroscopique des métastases pulmonaires dans le modèle 4T1. Les valeurs individuelles représentent la moyenne de 2 comptages effectués de manière aveugle au moment de l'euthanasie des animaux à D30. Les barres noires représentent la médiane du groupe (effectif de 10 animaux) dont la valeur est précisée. Les données ont été analysées statistiquement par un test de Tukey.

3.1.3. Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire

Comme décrit dans l'introduction, dans le cadre du cancer, les principales cellules responsables de la réponse immunitaire anti-tumorale sont les lymphocytes T CD8+, dits cytotoxiques ou effecteurs (Teff). En plus des mécanismes d'autorégulation liés aux checkpoints immunitaires, certaines populations cellulaires ont pour but de moduler ces effecteurs afin de prévenir les réactions auto-immunes. C'est notamment le cas des lymphocytes T CD4+FoxP3+ dits régulateurs (Treg), qui font partie des lymphocytes T helper (CD4+) et que certaines tumeurs parviennent à recruter pour participer à la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur afin de se protéger. Aussi, la détection de cette sous population lymphocytaire au sein des tumeurs et/ou des ganglions lymphatiques drainants chez l'homme ou l'animal est associée à un mauvais pronostic [40, 41]. Le calcul du *ratio* Teff/Treg au sein de ces tissus permet donc de préciser la tendance pro ou anti-tumorale de leur environnement.

3.1.3.1. Analyse de l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur

La **Figure 20** présente pour chaque modèle et chaque groupe le *ratio* individuel Teff/Treg déterminé grâce aux quantifications obtenues par cytométrie de flux.

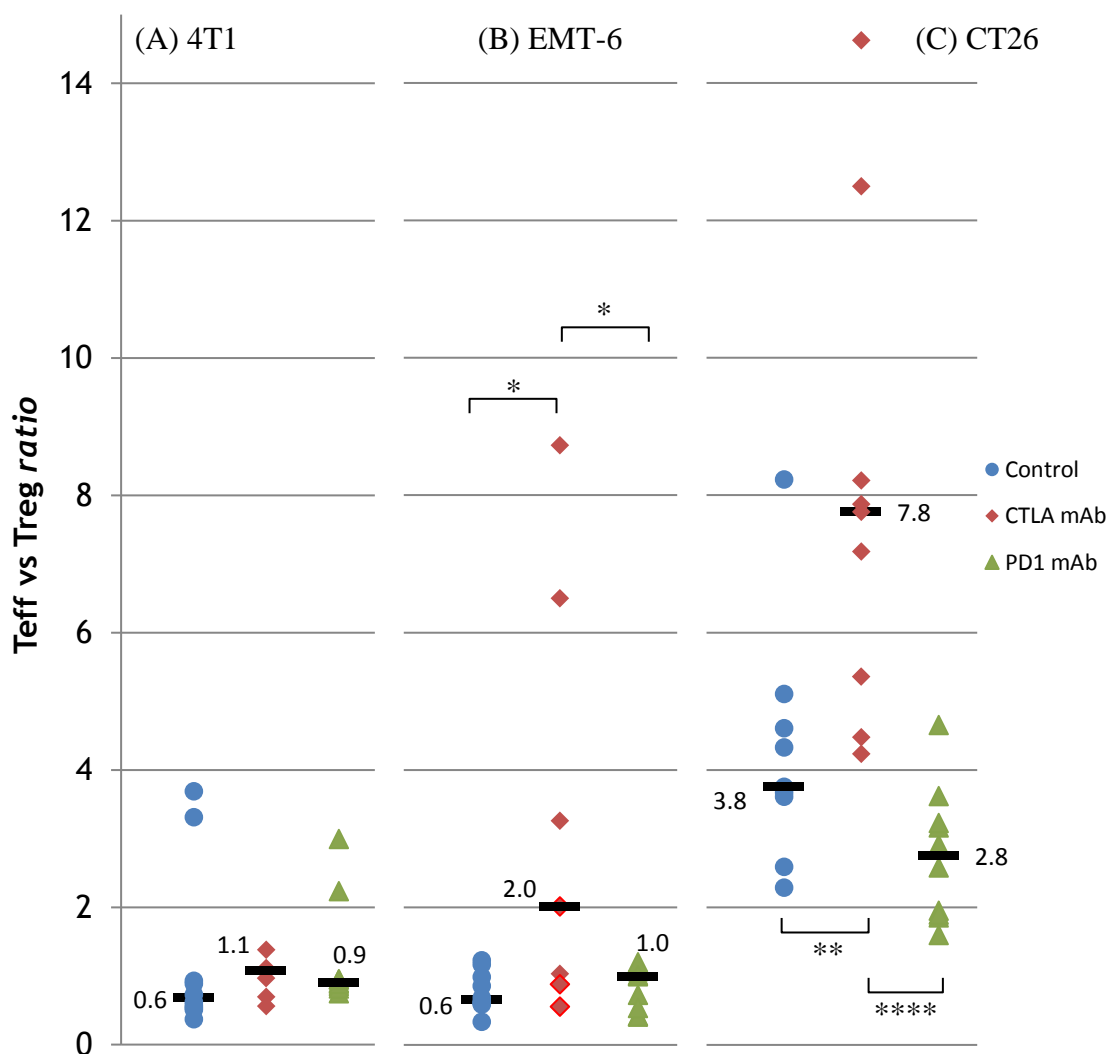


Figure 20 : Ratios individuels Teff/Treg au sein de la tumeur par modèle et par groupe. Ces ratios ont été calculés avec les mesures effectuées à D29, D27 et D21 respectivement pour 4T1 (A), EMT-6 (B) et CT26 (C) permettant de quantifier les populations de lymphocytes T effecteurs (Teff, CD8+) et régulateurs (Treg, FoxP3+) par cytométrie en flux de chacun des 10 animaux de chaque groupe. Les barres noires représentent la médiane du groupe dont la valeur est précisée. Les données ont été analysé par un test de Tukey (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).

Concernant les groupes contrôles, la **Figure 20** indique qu'il existe des différences importantes entre les modèles en termes d'immunogénicité. En effet, CT26 affiche un *ratio* médian Teff/Treg de base 6 fois plus élevé que les 2 autres modèles (3,8 pour CT26 avec des valeurs comprises entre 2,3 et 8,2 ; 0,6 pour 4T1 avec des valeurs comprises entre 0,4 et 3,7 ; 0,6 pour EMT-6 avec des valeurs comprises entre 0,3 et 1,2), ce qui signifie qu'il y a, au sein de cette tumeur, 6 fois plus de Teff que de Treg, traduisant une immunogénicité naturellement élevée et donc une prédisposition à répondre aux immunothérapies. Le *ratio* de 0,6 pour les 2 autres modèles signifie donc qu'il y a plus de Treg que de Teff au sein de la tumeur et donc qu'il y a probablement une forte inhibition de la réponse immunitaire.

Concernant les groupes traités, l'efficacité et l'hétérogénéité observées au niveau des volumes tumoraux se retrouvent sur les *ratios* Teff/Treg au sein de la tumeur. En effet, pour le modèle 4T1 qui semblait peu sensible aux traitements administrés au regard des croissances tumorales présentées précédemment, aucun effet significatif n'est constaté sur l'infiltrat lymphocytaire. Pour les modèles CT26 et EMT-6, aucun effet sur l'infiltrat n'est constaté avec l'anticorps anti-PD1 contrairement à l'anticorps anti-CTLA-4 qui provoque une infiltration significative de lymphocytes T effecteurs et/ou une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs, se traduisant par une augmentation du *ratio* Teff/Treg. Comme observé sur la croissance tumorale, le modèle 4T1 semble donc plutôt résistant aux anticorps choisis contrairement à CT26 et EMT-6.

C'est également avec l'anticorps anti-CTLA-4 que l'hétérogénéité des *ratios* Teff/Treg est la plus importante pour les modèles EMT-6 et CT26. Etant donné que les lymphocytes T effecteurs portent l'activité anti-tumorale, un *ratio* Teff/Treg élevé devrait hypothétiquement correspondre à un fort ralentissement de la croissance tumorale et vice-versa. Cette hypothèse est vérifiée pour EMT-6. En effet, la **Figure 21** permet de corréler pour certains animaux qu'un *ratio* Teff/Treg faible est associé à un manque d'activité antitumorale.

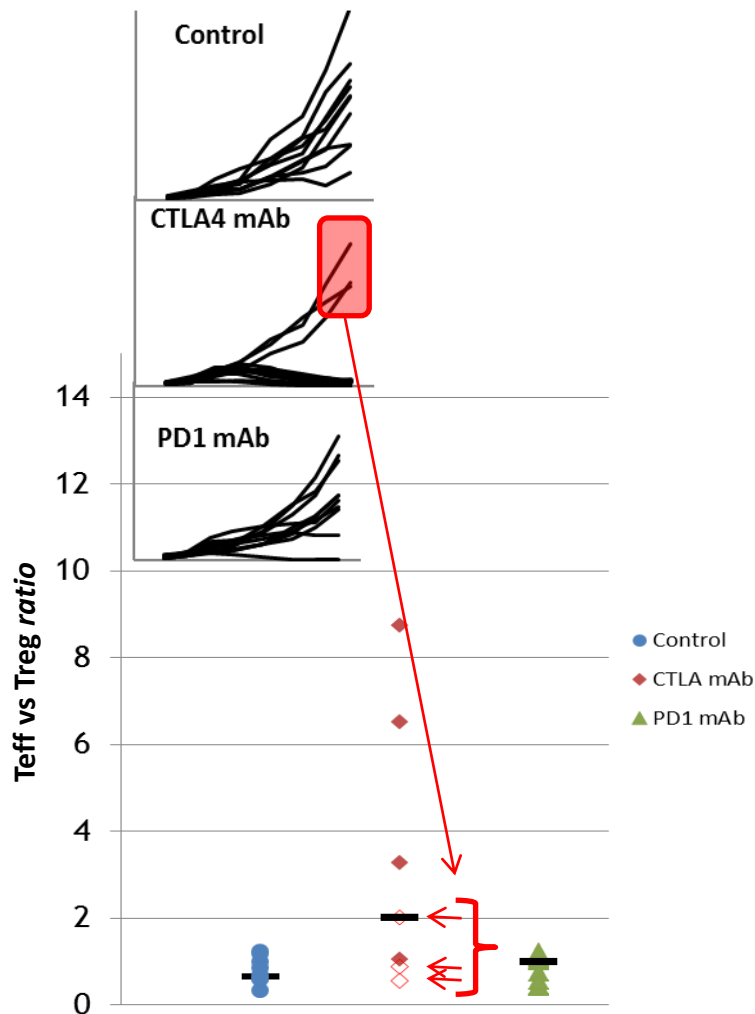


Figure 21 : Corrélation entre le *ratio* Teff/Treg et la croissance tumorale pour le modèle EMT-6. Pour le groupe traité à l'anticorps anti-CTLA-4, les points pleins correspondent aux animaux répondeurs, c'est-à-dire aux animaux pour lesquels la tumeur a régressé comme indiqué par les courbes de croissances individuelles en haut de la figure. Les points vides correspondent aux animaux non répondeurs.

Pour le groupe traité à l'anticorps anti-CTLA-4, comme indiqué précédemment, 2 sous populations se distinguent par leur réponse au traitement. Ainsi, les 3 animaux qui ne répondent pas ont une tumeur en forte croissance alors que celles du reste du groupe sont en régression. Les tumeurs de ces 3 souris sont parmi celles qui affichent un *ratio* Teff/Treg parmi les plus faibles, ce qui est cohérent avec l'hypothèse formulée. Néanmoins, dans ce même groupe, d'autres animaux ont un *ratio* faible et ont pourtant une tumeur en régression. Pour les autres groupes et les autres modèles, ce type de corrélation n'a pas pu être effectué : des animaux répondeurs ont parfois un *ratio* faible alors que d'autres qui présentent un *ratio* plutôt élevé ont une tumeur de taille importante. Si les lymphocytes T effecteurs sont les

principaux acteurs de la réponse anti-tumorale, ce n'est pas la seule population impliquée dans ce processus. Les lymphocytes NK et les macrophages de type M1 notamment sont d'autres types cellulaires ayant un rôle important dans l'inhibition de la croissance tumorale. Aussi, le *ratio* Teff/Treg ne permet donc pas à lui seul de justifier ou non la réponse anti-tumorale puisque toutes les populations de cellules immunitaires ayant un impact n'ont pas été regardées dans cette étude. Il sera donc nécessaire de corrélérer l'activité anti-tumorale avec des détections plus poussées de toutes les sous-populations de cellules immunitaires impliquées. Ceci est en cours de développement au laboratoire.

3.1.3.2. Analyse de l'infiltrat immunitaire au sein des ganglions

Cette analyse a également été reproduite au niveau des ganglions drainants la tumeur dont les données sont représentées dans la **Figure 22**. En effet, le récepteur CTLA-4 est impliqué dans l'inhibition des lymphocytes T CD8+ de manière précoce, lorsque les cellules présentatrices d'antigènes activées les rencontrent dans le système lymphatique. En revanche, PD1 intervient plutôt dans les tissus périphériques, après migration des lymphocytes T activés, et donc plus tardivement. Il est donc rationnel de caractériser les populations lymphocytaires infiltrées dans les ganglions afin de mettre en évidence les différents effets des traitements.

Tout comme décrit précédemment à propos des infiltrats intra tumoraux, les *ratios* Teff/Treg au sein des ganglions drainants des groupes contrôles différent selon les modèles. Ainsi, la faible immunogénicité de 4T1 est confirmée ici puisque ce modèle induit peu d'infiltration de lymphocytes T effecteurs dans les ganglions, tandis qu'EMT-6 présente un *ratio* Teff/Treg 2 fois supérieur à 4T1 et environ 3 fois supérieur pour CT26. En revanche, aucune différence de *ratio* n'est apportée par les différents traitements. A noter que contrairement aux tumeurs, les ganglions présentent un *ratio* proportionnellement plus élevé, ce qui est attendu de par leur rôle dans le système immunitaire. Egalement, au sein de chaque groupe, l'hétérogénéité des ratios dans la tumeur est retrouvée ici dans les ratios des ganglions drainants et donc peut amener une réponse anti-tumorale différente selon les individus.

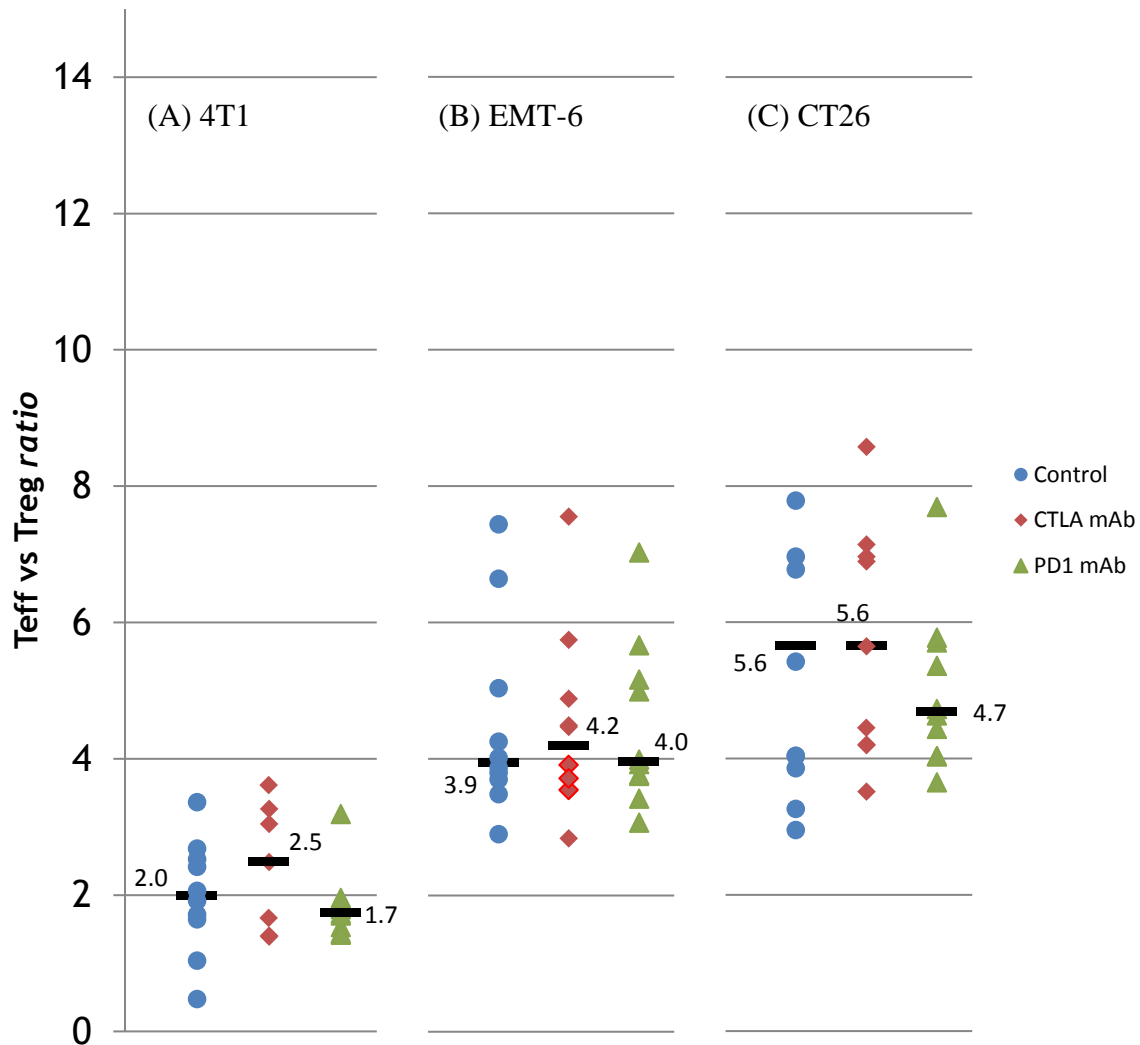


Figure 22 : Ratios individuels Teff/Treg au sein des ganglions drainants la tumeur, par modèle et par groupe. Ces ratios ont été calculés avec les mesures effectuées à D29, D27 et D21 respectivement pour 4T1 (A), EMT-6 (B) et CT26 (C) permettant de quantifier les populations de lymphocytes T effecteurs (Teff, CD8+) et régulateurs (Treg, CD4+/FoxP3+) de chacun des 10 animaux de chaque groupe. Les barres noires représentent la médiane du groupe dont la valeur est précisée. Les données ont été analysées statistiquement par un test de Tukey.

3.1.4. Létalité

Au cours des différentes répétitions d'expériences, une létalité importante a été observée sur le modèle 4T1 chez les animaux traités à l'anticorps anti-CTLA-4 ou anti-PD1. Ce phénomène se traduit, immédiatement après l'injection, par une posture prostrée des souris accompagnée d'une piloérection et de difficultés respiratoires pour aboutir à leur mort environ

30 minutes après administration du 4^{ème} traitement sans signe macroscopique avant-coureur. Ces symptômes sont typiques des chocs anaphylactiques observés en clinique dues à de fortes réactions allergiques pouvant entraîner la mort des individus par arrêt respiratoire et/ou cardiaque principalement.

Ce type de résultats a été également décrit dans la littérature. La létalité a été observée uniquement sur les souris porteuses de 4T1 et semble être due à une réaction d'hypersensibilité liée à la nature xénogénique des anticorps administrés chez des animaux conditionnés [42]. Cette hypersensibilité semble être corrélée à une forte infiltration pulmonaire de neutrophiles et pourrait être provoquée par une sécrétion massive de cytokines et/ou d'immunoglobulines de type IgG1. La mort des animaux survient suite à un certain nombre de traitements suggérant donc un effet cumulatif d'activation des cellules immunitaires accompagné d'une escalade dans l'émission de cytokines. Cette émission massive est appelée choc cytokinique dont l'expression anglaise couramment employée pour nommer ce phénomène est « cytokine storm » (tempête cytokinique) [42].

Suite aux résultats obtenus sur les souris porteuses du modèle 4T1 indiquant une toxicité aigüe et fatale et suggérant une résistance aux traitements administrés comparativement aux autres modèles syngéniques, des essais avec d'autres inhibiteurs de checkpoints immunitaires, seuls ou en combinaison, ont été réalisés. Ces essais avaient pour but, d'une part, de trouver de nouveaux contrôles positifs dans ce modèle et, d'autre part, de déterminer si la mortalité due au traitement est liée à l'inhibition de cibles particulières. De la même manière, le modèle 4T1 étant résistant aux thérapies classiques, il était important d'observer les effets de traitements ciblant de nouveaux checkpoints immunitaires en combinaison.

3.2. Evaluation de l'activité anti-tumorale d'inhibiteurs de checkpoints immunitaires seuls ou en combinaison sur le modèle 4T1

3.2.1. Design expérimental

Suite aux premières expériences réalisées avec les anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD1, de nombreux autres anticorps ciblant de nouveaux checkpoints immunitaires spécifiques de la souris ont été mis sur le marché. Etant donné que ces deux premiers anticorps sont donnés en combinaison dans un très grand nombre d'essais cliniques et qu'ils ciblent des molécules dont l'intérêt scientifique qui leur est porté est révélateur de leur potentiel thérapeutique important,

l'objectif de cette expérience est de combiner chacun de ces deux anticorps avec d'autres ICI afin de mettre en évidence un effet synergique potentiel. Le modèle de tumeur 4T1, connu et largement décrit comme étant résistant à l'inhibition de nombreux checkpoints immunitaires était donc un modèle de choix pour ce type d'étude pouvant éventuellement mimer les phénomènes de résistances observés chez l'homme. De plus, il doit être notifié que la résistance de ce modèle aux anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD1 est aussi due à une limitation de leur utilisation qui, après quatre injections, induit un choc anaphylactique chez les souris traitées.

En outre, il a été démontré que les cellules 4T1 expriment à leur surface PD-L1, ce qui leur permet notamment d'inhiber directement les lymphocytes T effecteurs [44]. Il était donc judicieux d'insister sur la voie PD1/PD-L1 concernant ce modèle en ciblant aussi PD-L1. La seconde cible est 4-1BB, également appelée CD137, pour laquelle un anticorps agoniste a été développé. Cette molécule appartient à la famille des récepteurs au TNF- α , impliquant ainsi des voies de signalisation différentes de CTLA-4 et PD1 qui font partie des récepteurs de la famille B7. De plus, 4-1BB est un checkpoint immunitaire activateur contrairement aux 2 autres voies dont le rôle est inhibiteur vis-à-vis de la réponse immunitaire. La **Figure 23** présente en outre les effets potentiels d'un tel anticorps sur les différentes populations de cellules immunitaires.

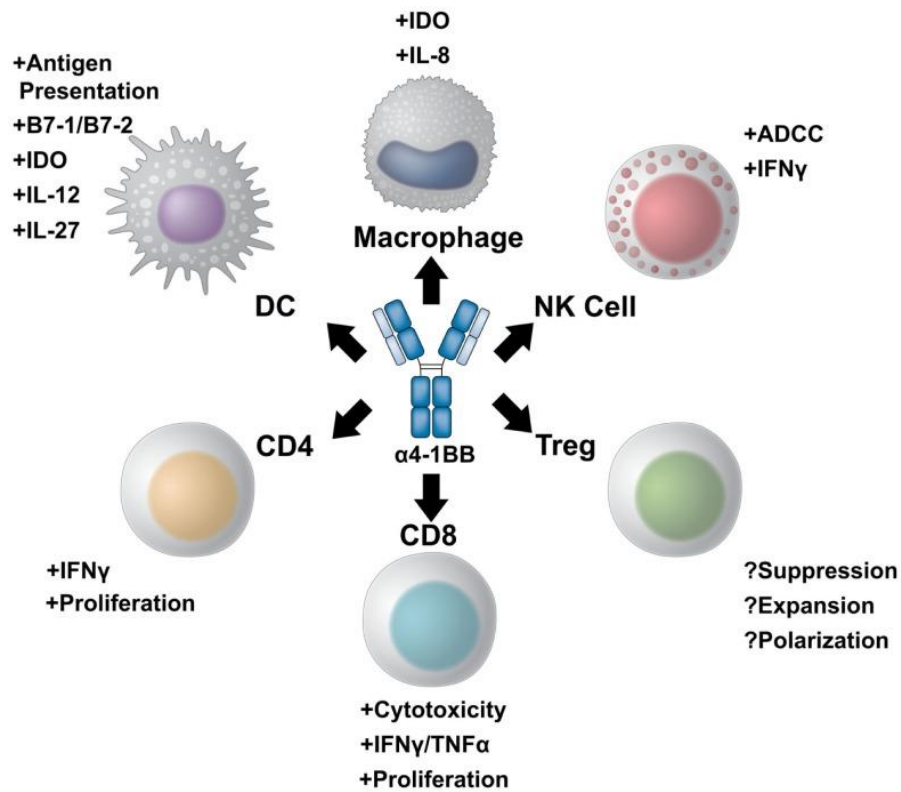


Figure 23 : Effets d'un anticorps agoniste anti-4-1BB sur la réponse immunitaire selon Bartkowiak et Curran [45]. Sur les lymphocytes T effecteurs (CD8), l'anticorps anti-4-1BB provoque une augmentation de leur prolifération, de leur toxicité et des émissions d'IFN γ et de TNF α . Chez les lymphocytes T régulateurs (Treg), les effets ne sont pas encore bien caractérisés. Une augmentation des phénomènes d'ADCC (Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity = Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) et un relargage d'IFN γ sont observés chez les cellules NK. Les émissions d'IFN γ sont également augmentées chez les lymphocytes T helper (CD4) accompagnées d'un accroissement de leur prolifération. Les cellules dendritiques (DC) émettent de l'IL-27, de l'IL12, de l'IDO et favorisent l'activation lymphocytaire par une meilleure présentation antigénique accompagnée de signaux de co-stimulation plus importants. Enfin, les macrophages émettent de l'IDO et de l'IL-8.

4-1BB présente donc un potentiel thérapeutique important et un intérêt particulier mettant en jeu des voies de signalisation différentes aux checkpoints immunitaires des voies PD1/PD-L1 et CTLA-4. Le **Tableau 9** récapitule ainsi le design expérimental de cette expérience.

Tableau 9 : Combinaisons d'anticorps étudiées dans le modèle 4T1.

Groupe	Effectif	Traitements	Dose	Schéma d'administration
1	7	-	-	-
2	7	Anti-PD1	10 mg/kg	TWx2
3	7	Anti-PD-L1	10 mg/kg	Q2Dx8
4	7	Anti-CTLA-4	10 mg/kg	TWx2
5	7	Anti-CTLA-4 (clone 9D9)	10 mg/kg	TWx2
6	7	Anti-4-1BB	10 mg/kg	TWx2
7	7	Anti-PD1	10 mg/kg	TWx2
		Anti-CTLA-4	10 mg/kg	TWx2
8	7	Anti-PD-L1	10 mg/kg	Q2Dx8
		Anti-CTLA-4	10 mg/kg	TWx2
9	7	Anti-4-1BB	10 mg/kg	TWx2
		Anti-PD1	10 mg/kg	TWx2
10	7	Anti-4-1BB	10 mg/kg	TWx2
		Anti-PD-L1	10 mg/kg	Q2Dx8
11	7	Anti-CTLA-4	10 mg/kg	TWx2
		Anti-4-1BB	10 mg/kg	TWx2

Il est important de souligner que comme PD-L1 est un ligand, il est nécessaire d'administrer plus fréquemment l'anticorps anti-PD-L1. En effet, pour que les récepteurs PD1 au niveau lymphocytaire ne soient pas activés, il faut bloquer suffisamment de ligands et assez longtemps pour pouvoir observer un effet du traitement d'après des travaux précédents.

Enfin, un second clone de l'anticorps anti-CTLA-4 est testé (clone 9D9) afin de vérifier l'influence du clone sur l'efficacité et/ou la toxicité induite dans le modèle 4T1.

Les paramètres évalués dans cette expérience sont le volume tumoral, le poids des animaux, le poids de la rate qui pourrait traduire une surproduction de cellules myéloïdes suppressives pro tumorales (particulièrement dans le modèle 4T1 [46, 47, 48]) et le taux de 25 cytokines circulantes liées au système immunitaire. Enfin, étant donné que les réactions anaphylactiques pourraient être associées à un infiltrat immunitaire important au niveau des bronches, principalement constitués de cellules polynucléées [42], une évaluation de cet infiltrat a été réalisée.

3.2.2. Réduction de la mortalité

Comme lors des expériences précédentes, le 4^{ème} traitement à l'anticorps anti-CTLA-4 ou anti-PD1 seul aboutit à un taux de mortalité après administration respectivement de 86 et 29%. L'anticorps anti-PD-L1, quant à lui, provoque également une forte mortalité avec un taux de 86%. Les combinaisons entre ces trois anticorps ne démontrent pas une meilleure tolérance. En revanche, l'anticorps anti-4-1BB, qui ne semble pas provoquer d'effets secondaires en monothérapie, présente un pouvoir protecteur important lorsqu'il est administré en combinaison avec les anticorps anti-PD1, anti-PD-L1 ou anti-CTLA-4. En effet, en combinaison avec l'anticorps anti-4-1BB, les taux de mortalité se réduisent considérablement pour atteindre 0% , 14% et 0% respectivement pour les anticorps anti-PD1, anti-PD-L1 et anti-CTLA-4. Le **Tableau 10** présente de manière résumée ces résultats.

Tableau 10 : Taux de mortalité après le dernier traitement pour les monothérapies et combinaisons évaluées dans le modèle 4T1. Chaque groupe est constitué d'un effectif de 7 animaux. NA = Non Applicable ; NT = Non Testé.

Monothérapies		Combinaisons			
		Anti-PD1	Anti-PD-L1	Anti-CTLA-4	Anti-4-1BB
Anti-PD1	29%	NA	NT	86%	0%
Anti-PD-L1	86%	NT	NA	71%	14%
Anti-CTLA-4	86%	86%	71%	NA	0%
Anti-4-1BB	0%	NA	NA	NA	NA
Anti-CTLA-4 (9D9)	29%	NT	NT	NT	NT

En reproduisant l'expérience, il a été démontré que le taux de mortalité peut varier et tous les animaux ne sont pas affectés. Ainsi, s'il existe des différences interindividuelles en termes de réponse au traitement, il pourrait en être de même concernant la toxicité. Certains animaux seraient donc plus enclins à produire une réaction anaphylactique que d'autres, éventuellement liée aussi aux interactions entre la tumeur et le système immunitaire de l'hôte.

Concernant le second clone de l'anticorps anti-CTLA-4, le clone 9D9, la diminution de la toxicité est réelle mais associée également à une diminution de l'effet anti-tumoral comme montré plus loin. Les toxicités observées en clinique sont liées au mode d'action de ces thérapies, et il semble donc logique que plus un anticorps est puissant, plus il a de chances d'induire des effets secondaires liés à l'immunité [10]. Cet anticorps ne présente donc pas d'intérêt majeur comparé au clone 9H10.

L'anticorps anti-4-1BB ne montre pas d'effets secondaires vis-à-vis de l'hôte. Il est intéressant de constater que les combinaisons avec cet anticorps sont bien moins fatales à l'hôte que les monothérapies avec les anticorps anti-CTLA-4, anti-PD1 et anti-PD-L1. Le système immunitaire étant très complexe et très peu étudié chez la souris, il est difficile d'expliquer cette protection. Des investigations devront être mises en place au laboratoire.

3.2.3. Efficacité des monothérapies et combinaisons d'ICI dans le modèle 4T1

3.2.3.1. Monothérapies

Etant donné la mortalité observée avec les combinaisons ciblant en même temps PD1 ou PD-L1 et CTLA-4 (**Tableau 10**), celles-ci ne présentent pas d'intérêt pour le modèle 4T1. Par conséquent, l'intérêt de cette expérience est porté sur les comparaisons entre les monothérapies et les combinaisons avec l'anticorps anti-4-1BB. Concernant les 2 anticorps ciblant CTLA-4, le clone 9D9 ne présente pas d'intérêt majeur par rapport au clone 9H10. En effet, s'il présente une toxicité plus faible, son efficacité est aussi diminuée comme l'indique la **Figure 24**. Il est donc important de noter que le choix du clone peut avoir des conséquences importantes et qu'il convient de bien évaluer les caractéristiques de chacun des anticorps testés en fonction du but recherché.

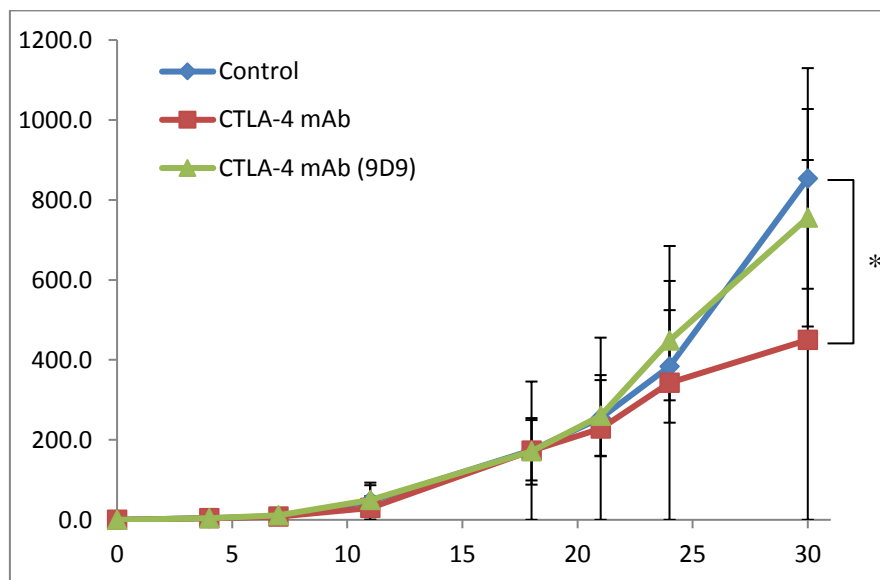


Figure 24 : Comparaison de l'efficacité anti-tumorale de deux clones anti-CTLA-4. Chaque point représente la moyenne des volumes tumoraux des 7 animaux du groupe le jour de la mesure et les barres d'erreur, l'écart type correspondant. Le premier traitement a eu lieu à D18 avec un volume tumoral moyen de 174, 172,9 et 171,2 respectivement pour les groupes contrôles, anti-CTLA-4 et anti-CTLA-4 (9D9). D0 représente l'injection des cellules tumorales. Les mesures au-delà de D30 ne sont pas représentées car une partie des animaux traités à l'anticorps anti-CTLA-4 (clone 9H10) est décédée suite au dernier traitement. Les données ont été analysés statistiquement par un test de Tukey (* $p \leq 0,05$).

L'efficacité des monothérapies d'intérêt peut ainsi être évaluée *via* la **Figure 25**. Celle-ci montre donc que l'anticorps anti-CTLA-4 est le seul ICI à démontrer une activité anti-tumorale significative. Sa toxicité l'empêche en revanche d'être utilisé comme une molécule de référence. De la même manière, l'anticorps anti-PD-L1 montre une mortalité importante suite à la 4^{ème} administration. Pour cet anticorps administré tous les 2 jours, les souris décèdent encore plus rapidement, à savoir D26 ici. Les anticorps anti-PD1 et anti-4-1BB semblent avoir la même efficacité, moins importante que l'anticorps anti-CTLA-4 et non significative. En revanche, l'anticorps anti-PD1 provoque la mort d'une partie des animaux contrairement à l'anticorps anti-4-1BB.

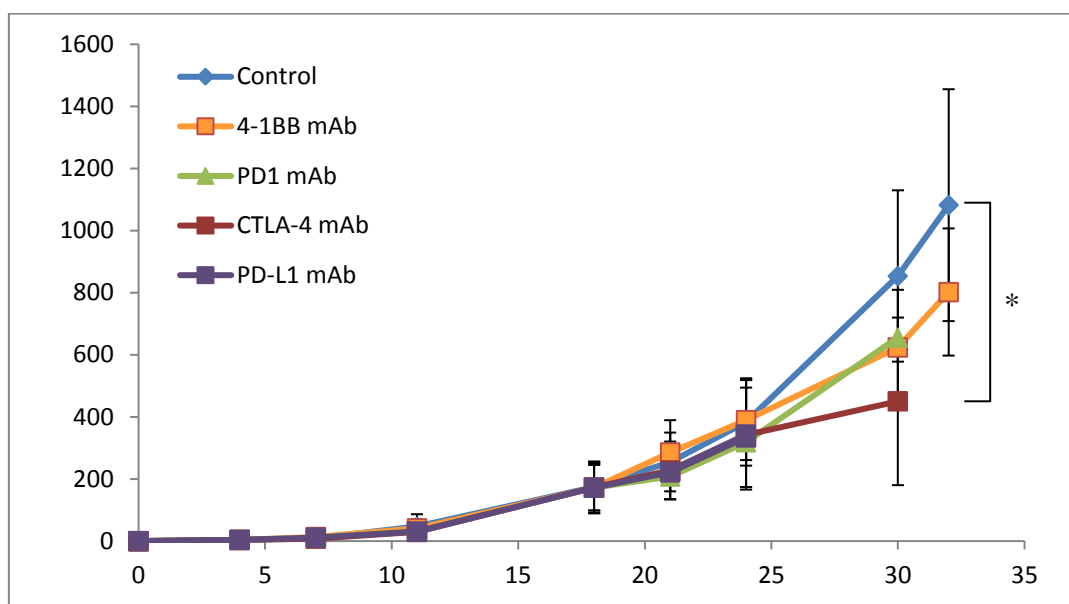


Figure 25 : Efficacité anti-tumorale de quatre ICI chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1. Chaque point représente la moyenne des volumes tumoraux des 7 animaux du groupe le jour de la mesure et les barres d'erreur, l'écart type correspondant. Le premier traitement a eu lieu à D18 avec un volume tumoral moyen de 174, 172,4, 171,6, 171,8 et 172,9, respectivement pour les groupes contrôle, anti-PD1, anti-4-1BB, anti-PD-L1 et anti-CTLA-4. D0 représente l'injection des cellules tumorales. Les mesures au-delà de D30 pour les anticorps anti-PD1 et anti-CTLA-4 et au-delà de D24 pour l'anticorps anti-PD-L1 ne sont pas représentées car une partie des animaux est décédée suite au 4^{ème} traitement. Les données ont été analysés statistiquement par un test de Tukey (* $p \leq 0,05$).

Les dosages de cytokines permettent également de mettre en évidence des différences d'effets entre ces anticorps, comme le présente la **Figure 26**. L'anticorps anti-4-1BB est celui qui induit le moins d'émissions de cytokines contrairement aux autres qui ont un profil

cytokinique nettement plus marqué. Ceci est corrélé avec la mortalité des animaux : en effet, les réactions de type anaphylactique observées sont liées à un relargage massif de cytokines par les cellules immunitaires. Plus précisément, il est intéressant de noter que l'anticorps anti-CTLA-4 induit une forte production d'interleukine 2 et d'interféron gamma qui sont 2 molécules connues pour leurs propriétés anti-tumorales et qui sont également employées sous forme synthétique en tant que traitement contre le cancer, ce qui peut expliquer en partie le potentiel de cet anticorps comparé aux 3 autres. De manière plus générale, les principaux changements induits par chaque traitement ont lieu au niveau des signaux Th1 anti-tumoraux. Ceci était attendu puisque les anticorps administrés ont un rôle anti-tumoral. Les taux des cytokines liées aux cellules myéloïdes sont globalement en hausse. Les signaux Th17 sont, quant à eux, plutôt bas et, pour le reste des cytokines, aucune tendance intéressante ne semble se dégager dans cette vision d'ensemble.

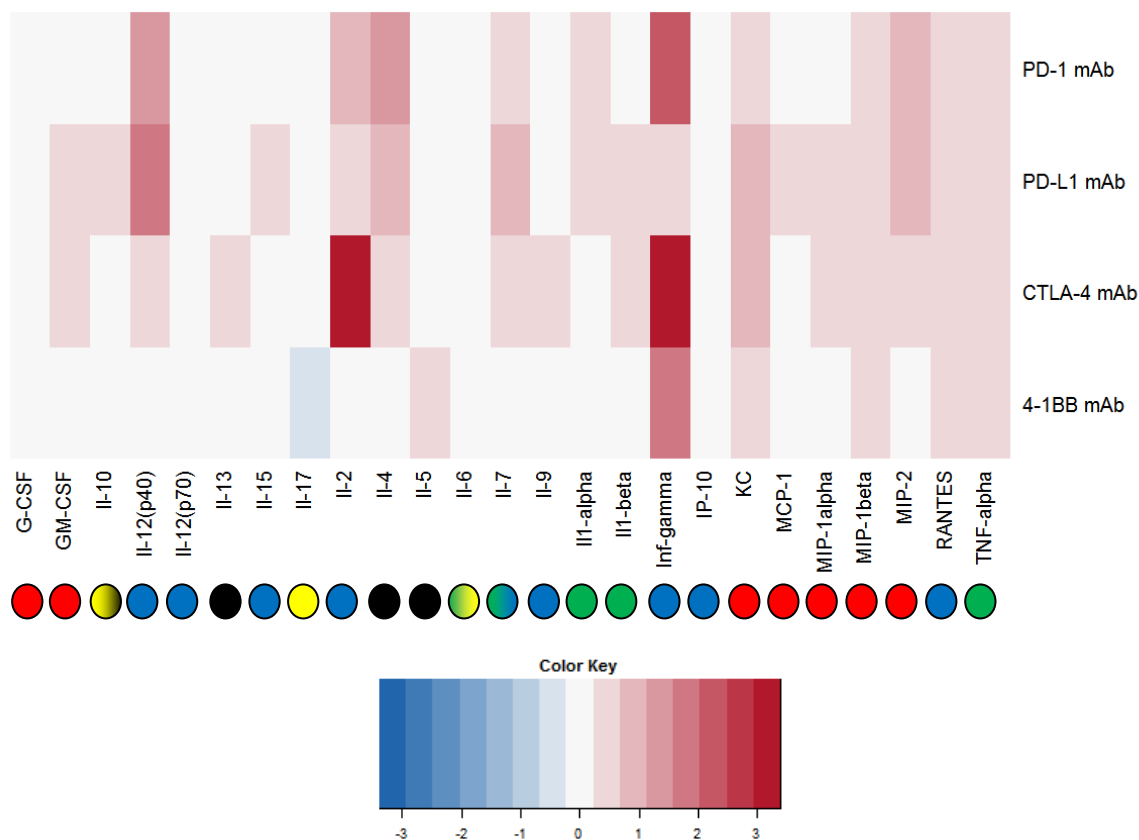


Figure 26 : Comparaison des taux de cytokines et chimiokines circulantes chez des souris porteuses de tumeur 4T1 et traitées avec différents ICI. Les données Luminex® (en pg/mL) ont été obtenues suite à des prélèvements sanguins à D32 sur les 7 animaux de chaque groupe. Elles ont tout d'abord été normalisées en échelle logarithmique par rapport au groupe contrôle via la formule suivante : $\log((\text{valeur}-\text{moyenne}_{\text{contrôle}})/\text{moyenne}_{\text{contrôle}})$. Un

z-score a ensuite été calculé à partir des valeurs normalisées, permettant de mettre en évidence pour chaque cytokine l'écart par rapport au groupe contrôle. Les écarts positifs tendent vers le rouge, les écarts négatifs vers le bleu comme représenté dans la légende en bas de figure. Les points de couleur indiquent le rôle principal de chaque cytokine : rouge = cellules myéloïdes ; bleu = réponse Th1 ; noir = réponse Th2 ; jaune = réponse Th17 ; vert = réponse pro inflammatoire. Certaines cytokines peuvent présenter plusieurs rôles principaux ce qui se traduit par 2 couleurs pour un même point.

3.2.3.2. PD1

D'après les mesures de volume tumoral présentées dans la **Figure 27**, les anticorps anti-4-1BB, anti-PD1 et leur combinaison induisent le même ralentissement de la croissance tumorale. En effet, les valeurs de T/C atteignent 64, 65 et 57% à D30 respectivement pour les groupes anti-PD1, anti-4-1BB et leur combinaison. Dans ce modèle, les résultats d'activité anti-tumorale ne sont pas significatifs et aucune synergie de la combinaison n'est observée. En revanche, une amélioration de la survie est observée de manière probante puisqu'aucune mortalité n'est apparue chez les animaux traités avec les deux anticorps combinés alors que l'anticorps anti-PD-L1 induit 29% de décès lors du dernier traitement.

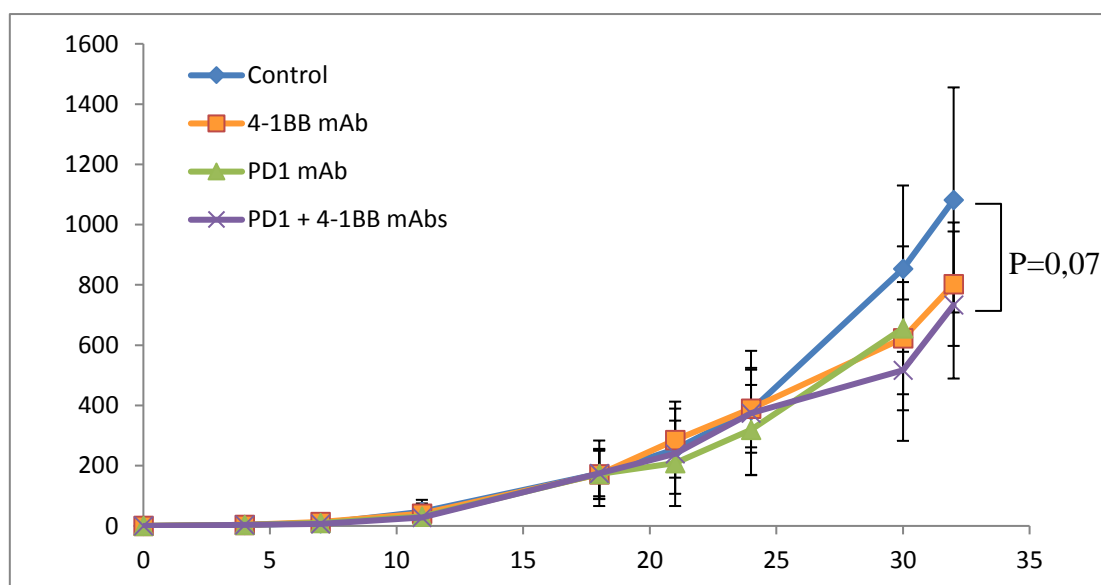


Figure 27 : Efficacité anti-tumorale de l'anti-PD1, de l'anti-4-1BB et de la combinaison des deux chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1. Chaque point représente la moyenne des volumes tumoraux des 7 animaux du groupe le jour de la mesure et les barres d'erreur, l'écart type correspondant. Le premier traitement a eu lieu à D18 avec un volume tumoral

moyen de 174, 172,4, 171,6 et 174,7 respectivement pour les groupes contrôle, anti-PD1, anti-4-1BB et la combinaison de ces deux anticorps. D0 représente l'injection des cellules tumorales. Les mesures au-delà de D30 ne sont pas représentées pour l'anticorps anti-PD1 car une partie des animaux est décédée suite au dernier traitement (29%, soit 2 animaux sur 7). Les données ont été analysées statistiquement par un test de Tukey.

Concernant l'infiltrat lymphocytaire dans les poumons, la **Figure 28** présente des clichés représentatifs des scorings déterminés sur les échantillons des groupes concernés dans ce paragraphe. L'anticorps anti-PD1 ne présente ainsi pas d'effet particulier avec un score de 0 (score égal au groupe contrôle). A contrario, les animaux traités à l'anticorps anti-4-1BB présentent une faible infiltration (score de 1) et la combinaison des deux anticorps une infiltration moyenne (score de 2), traduisant un potentiel effet anti-tumoral synergique. L'infiltration est périvasculaire et péribronchique mais rarement rencontrée à proximité des métastases.

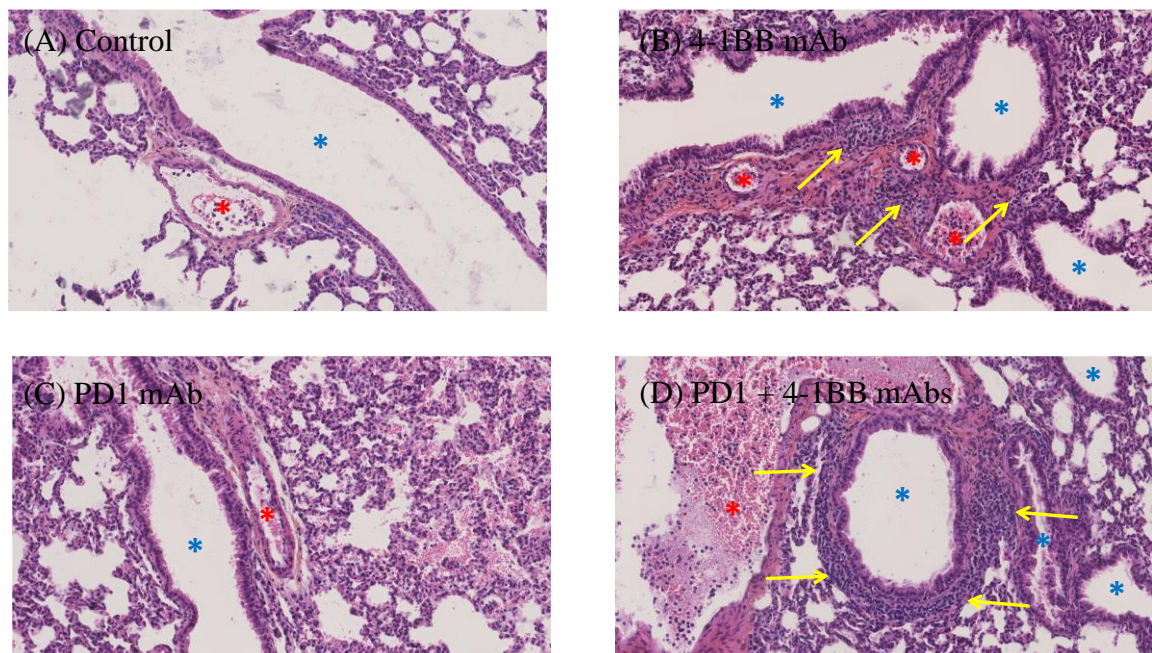


Figure 28 : Photographies représentatives d'infiltrations lymphocytaires pulmonaires chez des souris porteuses de tumeurs 4T1 et traitées à l'anti-PD1 et/ou l'anti-4-1BB. Les scores attribués sont compris entre 0 (pas d'infiltrat) et 3 (infiltrat lymphocytaire massif). Les scores correspondant aux photographies sont représentatifs des 7 animaux de chaque groupe et sont les suivants : A=0 ; B=1 ; C=0 ; D=2. Les étoiles bleues représentent les bronches et les étoiles rouges, les vaisseaux sanguins. Les flèches jaunes ciblent les infiltrations de

lymphocytes. Ces photographies ont été prises à un grossissement x200 de lames de poumons inclus en paraffine, portant des coupes de 5µm d'épaisseur et traitées par une coloration HE.

Le poids des rates ne révèle pas d'effets significatifs des différents traitements comme le montre la **Figure 29**. Néanmoins, une légère hausse est constatée chez les animaux traités avec l'anticorps anti-PD1 tandis que l'anticorps anti-4-1BB a pour effet de diminuer et homogénéiser les valeurs. Les effets de ce dernier se retrouvent dans la combinaison avec l'anti-PD1 puisque les valeurs sont plus faibles et plus homogènes que dans le groupe traité à l'anti-PD1 seul. Il doit être notifié que ces différences entre les groupes ne sont pas significatives, cependant, la distribution des valeurs révèle tout de même des effets biologiques en réponse aux traitements.

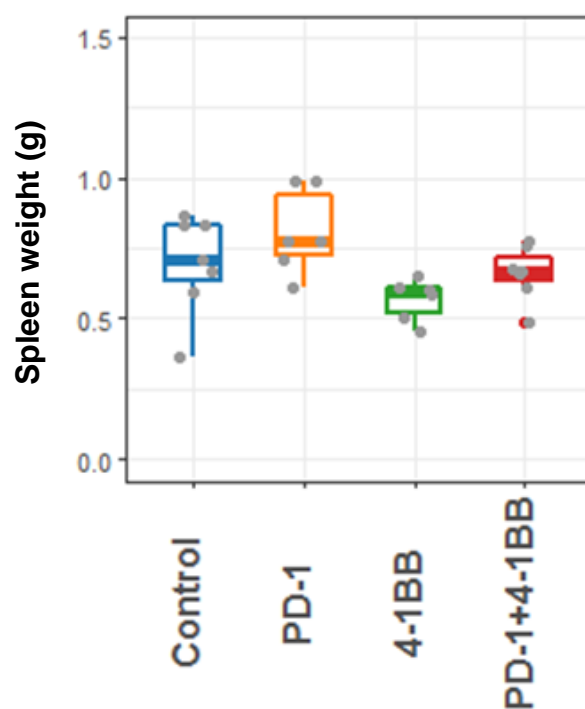


Figure 29 : Effets de l'anti-PD1, de l'anti-4-1BB et de la combinaison des 2 sur le poids des rates de souris porteuses de tumeurs 4T1. Les valeurs individuelles des 7 animaux de chaque groupe sont représentées par les points gris. Les rectangles représentent l'écart interquartile et les barres horizontales, la médiane. Les barres verticales représentent les premiers et 99^{ème} centiles et toute valeur au-delà de ces « moustaches » est considérée comme exceptionnelle. Les données ont été analysées par un test de Tukey.

En ce qui concerne les profils d'émission de cytokines, la **Figure 30** présente les résultats des dosages pour les groupes traités avec les anticorps anti-PD1 et/ou 4-1BB. De

manière générale, l'anticorps anti-PD1 induit un relargage massif et simultané de nombreuses cytokines, traduisant un emballement du système immunitaire, ce qui peut être assimilé à une *cytokine storm* comme décrit précédemment et pouvant conduire à la mort des animaux comme c'est le cas ici avec un taux de mortalité 29%. De son côté, l'anti-4-1BB semble rehausser de manière plus modérée les sécrétions de cytokines par rapport au groupe contrôle, traduisant un effet mesuré des traitements comparé à l'anticorps anti-PD1. L'association des 2 anticorps est intéressante dans le sens où le profil cytokinique est complètement différent des profils des monothérapies. En effet, l'anti-4-1BB rehausse les signaux cytokiniques faibles de l'anti-PD1 et diminue les signaux forts comme pour retrouver un certain équilibre aboutissant à une diminution de la toxicité. Il est également intéressant de noter que les cytokines de la réponse Th1 sont moins exprimées dans le groupe combinaison que dans le groupe PD-1 sans pour autant que l'efficacité anti-tumorale en soit affectée.

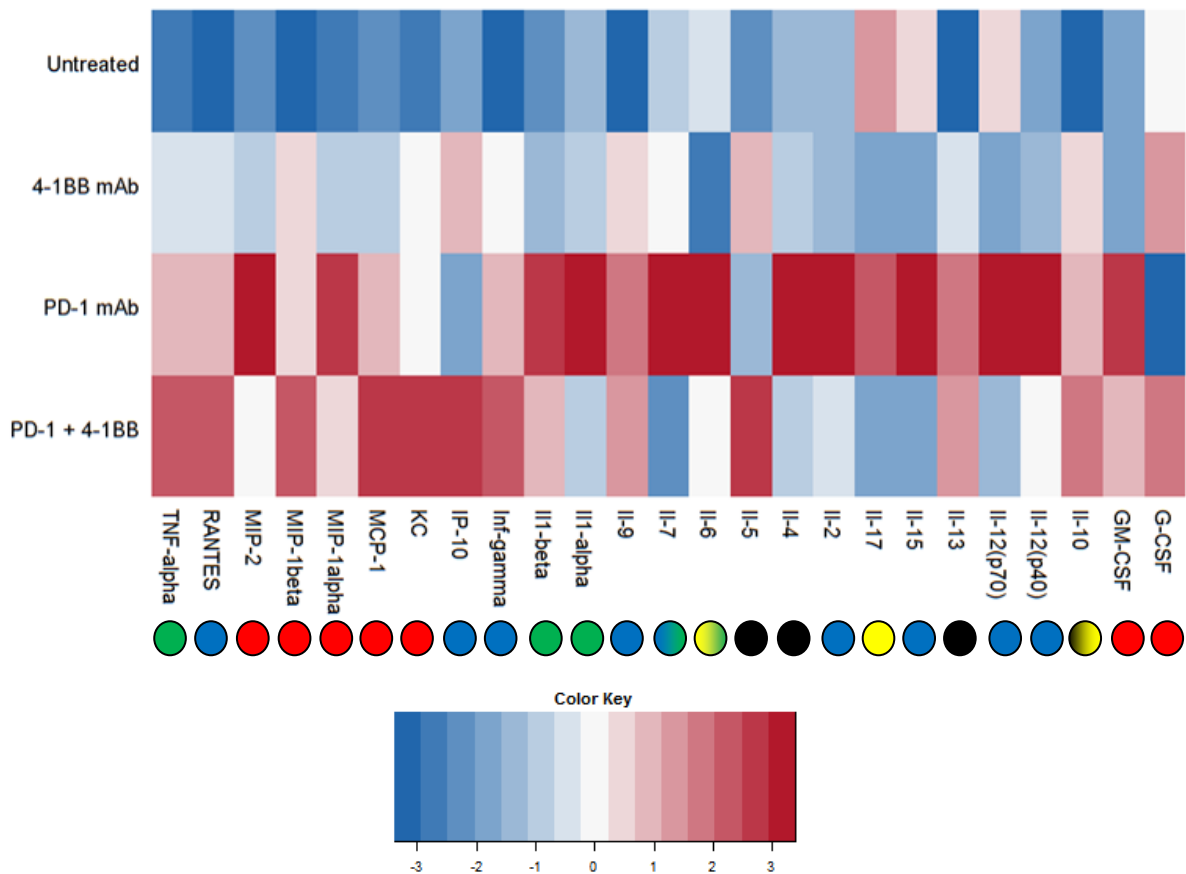


Figure 30 : Comparaison des taux de cytokines et chimiokines circulantes chez des souris porteuses de tumeur 4T1 et traitées à l'anti-PD1 et/ou à l'anti-4-1BB. Les données Luminex® (en pg/mL) ont été obtenues suite à des prélèvements sanguins à D32 sur les 7 animaux de chaque groupe. Elles ont tout d'abord été normalisées par rapport au groupe

contrôle via la formule suivante : $\log((\text{valeur}-\text{moyenne}_{\text{contrôle}})/\text{moyenne}_{\text{contrôle}})$. Un z-score a ensuite été calculé à partir des valeurs normalisées, permettant de mettre en évidence l'écart par rapport à la moyenne des dosages de cytokines tous groupes confondus pour chaque rangée. Les écarts positifs tendent vers le rouge, les écarts négatifs vers le bleu comme représenté dans la légende en bas de figure. Les points de couleur indiquent le rôle principal de chaque cytokine : rouge = cellules myéloïdes ; bleu = réponse Th1 ; noir = réponse Th2 ; jaune = réponse Th17 ; vert = réponse pro inflammatoire. Certaines cytokines peuvent présenter plusieurs rôles ce qui se traduit par 2 couleurs pour un même point.

3.2.3.3. PD-L1

Concernant l'anticorps anti-PD-L1 seul, sa toxicité ne permet pas d'évaluer son efficacité puisque les animaux meurent prématurément comme l'indique la **Figure 31**. Associé à l'anticorps anti-4-1BB, la mortalité diminue de 72% et une forte réponse anti-tumorale significative apparaît avec un *ratio* T/C de 37% à D30. Cet effet est bien plus important que celui de l'anticorps anti-4-1BB seul avec un *ratio* T/C de 65% à D30 (non significatif). Ces 2 molécules combinées permettent, en diminuant la mortalité, de visualiser l'activité anti-tumorale de l'anticorps anti-PD-L1.

A noter également que cette combinaison est significativement plus efficace que l'association avec l'anticorps anti-PD1 décrite ci-dessus (T/C de 37 *versus* 57%) (**Figure 27**). Ceci suggère que bloquer totalement les interactions de PD1 avec ses deux ligands connus PD-L1 et PD-L2 est moins efficace que de bloquer uniquement les interactions avec PD-L1 (exprimé par la tumeur). Dans la littérature, PD-L2 est décrit comme jouant un rôle anti-tumoral. Bloquer sélectivement PD-L1 et laisser les interactions avec PD-L2 libres semble être plus bénéfique. Ce dernier est exprimé principalement par les cellules dendritiques et les macrophages [20]. Son rôle n'est pas encore clairement défini par rapport à PD-L1, mais cette pluralité de ligands mène forcément à des variations d'effets biologiques notoires. Ainsi, beaucoup d'études suggèrent que PD-L2 a un rôle plutôt immunosuppresseur [49], tandis que certains modèles mettent en évidence un effet stimulateur de PD-L2 sur les lymphocytes iNKT (invariant Natural Killer T) ; population de cellules anti-tumorales [20, 50]. Dans tous les cas, PD-L2 semble avoir un rôle clé dans la régulation de la réponse Th2 (T helper 2), réponse qui est reconnue majoritairement comme étant pro tumorale mais dont certaines recherches lui attribuent un rôle ambigu et dépendant du contexte [49, 51]. Dans plusieurs essais cliniques, les médecins ont de plus observé que les traitements inhibiteurs de PD-L1

sont généralement moins toxiques que ceux ciblant PD1, traduisant un effet significatif de PD-L2 quant à la tolérance du traitement [52]. Par conséquent, il est complexe d'expliquer par quels moyens PD-L2 agit ici mais, dans ce modèle, laisser le champ libre en bloquant seulement PD-L1 semble être avantageux.

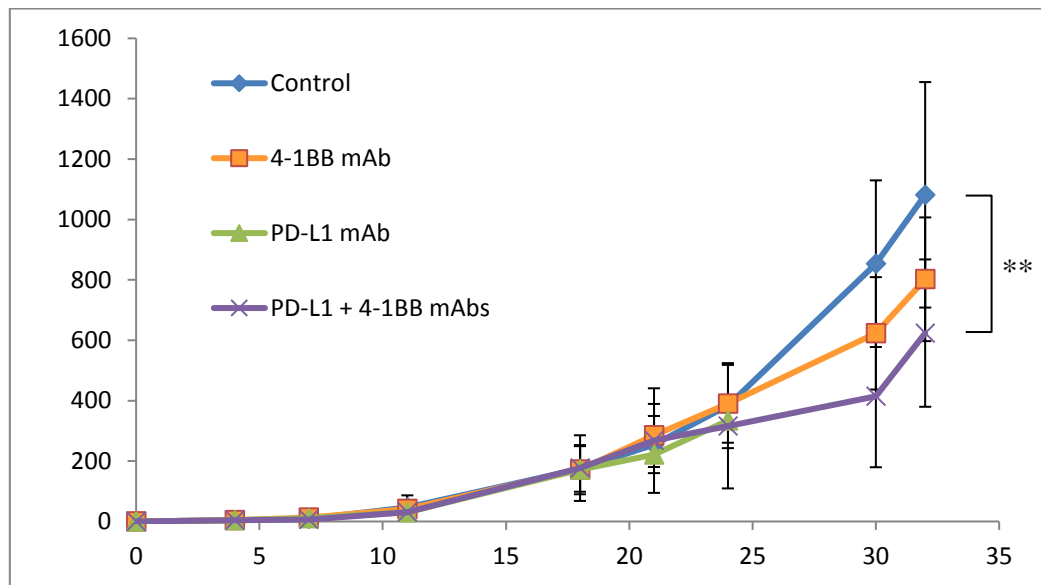


Figure 31 : Efficacité anti-tumorale de l'anti-PD-L1, de l'anti-4-1BB ou de la combinaison des deux chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1. Chaque point représente la moyenne des volumes tumoraux des 7 animaux du groupe le jour de la mesure et les barres d'erreur, l'écart type correspondant. Le premier traitement a eu lieu à D18 avec un volume tumoral moyen de 174, 171,8, 171,6 et 176,8 respectivement pour les groupes contrôles, anti-PD-L1, anti-4-1BB et la combinaison de ces 2 anticorps. D0 représente l'injection des cellules tumorales. Les mesures au-delà de D24 ne sont pas représentées pour l'anti-PD-L1 car une partie des animaux est décédée suite au dernier traitement (86%, soit 6 animaux sur 7). Les données ont été analysées statistiquement par un test de Tukey (** $p \leq 0,01$).

Tout comme l'anticorps anti-PD1 seul, l'anticorps anti-PD-L1 ne présente pas d'effet sur l'infiltration lymphocytaire pulmonaire avec un score de 0, comme l'indique la **Figure 32**. En revanche, la combinaison des anticorps anti-PD-L1/anti-4-1BB induit une infiltration massive avec un score de 3, reflétant l'activité anti-tumorale décrite précédemment dans les courbes de croissance. Tout comme l'effet observé sur la taille des tumeurs, cette combinaison est en effet plus puissante que la combinaison avec l'anti-PD1.

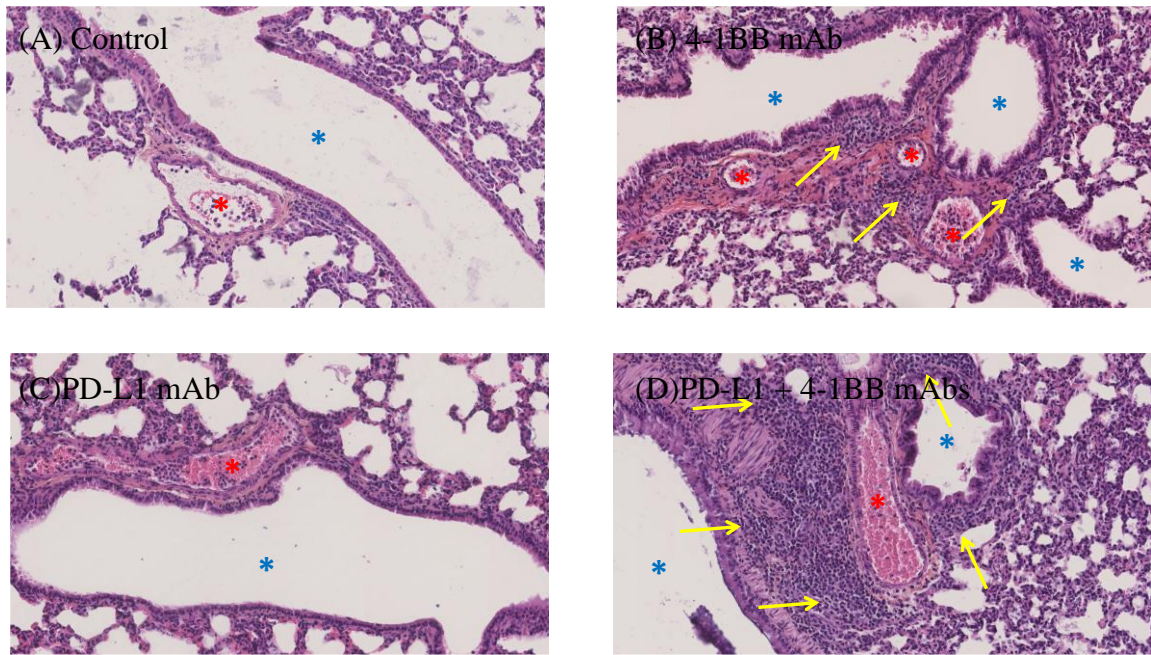


Figure 32 : Photographies représentatives d'infiltrations lymphocytaires pulmonaires chez des souris porteuses de tumeurs 4T1 et traitées à l'anti-PD-L1 et/ou l'anti-4-1BB. Les scores attribués sont compris entre 0 (pas d'infiltrat) et 3 (infiltrat lymphocytaire massif). Les scores correspondant aux photographies sont représentatifs des 7 animaux de chaque groupe et sont les suivants : A=0 ; B=1 ; C=0 ; D=3. Les étoiles bleues représentent les bronches et les étoiles rouges, les vaisseaux sanguins. Les flèches jaunes ciblent les infiltrations de lymphocytes. Ces photographies ont été prises à un grossissement x200 de lames de poumons inclus en paraffine, portant des coupes de 5 μ m d'épaisseur et traitées par une coloration HE.

Concernant le poids des rate, une différence significative existe entre les groupes traités avec les anticorps anti-PD1 (**Figure 29**) et anti-PD-L1 (**Figure 33**) ($p < 0,01$, test de Tukey). En effet, les animaux présentent une rate plus grosse après traitement à l'anticorps anti-PD1 seul versus l'anticorps anti-PD-L1 seul. Etant donné que ce dernier est significativement plus efficace que l'anticorps anti-PD1, les cellules colonisant la rate des animaux du groupe traité avec l'anticorps anti-PD1 ne sont probablement pas bénéfiques pour la réponse anti-tumorale mais ceci devrait être vérifié par une caractérisation des populations immunitaires spléniques. Néanmoins, comme indiqué précédemment, certains chercheurs ont mis en évidence une présence massive de cellules myéloïdes suppressives pro tumorales dans la rate de souris porteuses de tumeurs 4T1, ce qui est cohérent avec les observations réalisées ici [46, 47, 48].

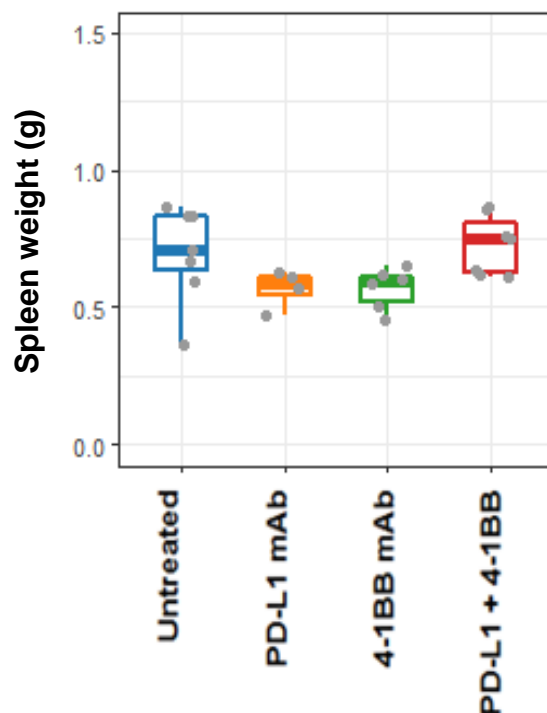


Figure 33 : Effets de l’anti-PD-L1, de l’anti-4-1BB et de la combinaison des 2 sur le poids des rates de souris porteuses de tumeurs 4T1. Les valeurs individuelles des 7 animaux de chaque groupe sont représentées par les points gris. Les rectangles représentent l’écart interquartile et les barres horizontales, la médiane. Les barres verticales représentent les premiers et 99^{ème} centiles et toute valeur au-delà de ces « moustaches » est considérée comme exceptionnelle. Les données ont été analysées statistiquement par un test de Tukey.

Dans la **Figure 34**, le profil cytokinique après traitement avec l’anticorps anti-PD-L1 seul est très similaire à celui des animaux traités avec l’anticorps anti-PD1 présenté dans la **Figure 30**. La quantité de cytokines retrouvée dans le sang est très importante et donc assimilable à un *cytokine storm* engendrant la mort de 86% des animaux dans ce groupe. Aussi, l’anti-4-1BB induit à peu près les mêmes modifications d’expression lorsqu’il est administré en combinaison avec chacun de ces 2 anticorps. Ainsi, il semble balancer la force des signaux émis par l’anticorps anti-PD-L1 sans affecter l’efficacité anti-tumorale des traitements et en apportant même une diminution de leur toxicité.

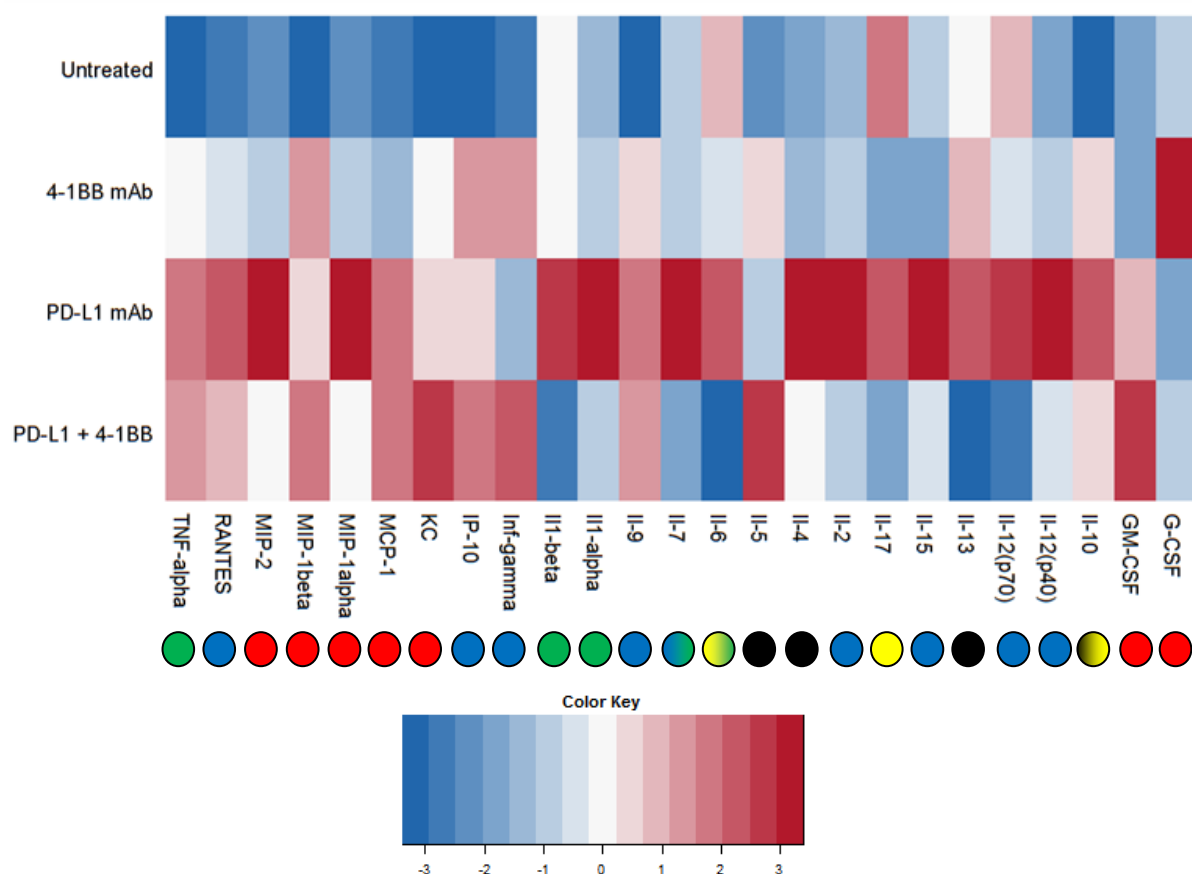


Figure 34 : Comparaison des taux de cytokines et chimiokines circulantes chez des souris porteuses de tumeur 4T1 et traitées à l’anti-PD-L1 et/ou à l’anti-4-1BB. Les données Luminex® (en pg/mL) ont été obtenues suite à des prélèvements sanguins à D32 sur les 7 animaux de chaque groupe. Elles ont tout d’abord été normalisées par rapport au groupe contrôle via la formule suivante : $\log((\text{valeur-moyenne}_{\text{contrôle}})/\text{moyenne}_{\text{contrôle}})$. Un z-score a ensuite été calculé à partir des valeurs normalisées, permettant de mettre en évidence l’écart par rapport à la moyenne des dosages de cytokines tous groupes confondus pour chaque rangée. Les écarts positifs tendent vers le rouge, les écarts négatifs vers le bleu comme représenté dans la légende en bas de figure. Les points de couleur indiquent le rôle principal de chaque cytokine : rouge = cellules myéloïdes ; bleu = réponse Th1 ; noir = réponse Th2 ; jaune = réponse Th17 ; vert = réponse pro inflammatoire. Certaines cytokines peuvent présenter plusieurs rôles ce qui se traduit par 2 couleurs pour un même point.

3.2.3.4. CTLA-4

Tout comme l’anti-PD-L1, la toxicité de l’anti-CTLA-4 est telle que son efficacité est anéantie. Si la combinaison avec l’anti-4-1BB permet de supprimer la mortalité, elle ne lui apporte en revanche pas de bénéfices en termes d’efficacité. En effet, comme représenté dans

la **Figure 35**, les courbes de croissance moyenne des groupes monothérapie et combinaison se superposent jusqu'au traitement induisant la mortalité (D30). A noter également que la combinaison est plus efficace que l'anticorps-4-1BB seul, avec des T/C de 54 et 71% respectivement à D32. Un gain d'efficacité est donc constaté pour l'anticorps anti-4-1BB associé à une diminution de la mortalité de l'anticorps anti-CTLA-4. Comme illustré dans la **Figure 36**, ces effets se retrouvent au niveau des infiltrations de lymphocytes dans les poumons. En effet, si l'anti-CTLA-4 et l'anti-4-1BB seuls affichent un score de 1, la combinaison affiche un score de 3 traduisant une infiltration de lymphocytes plus importante chez ces animaux.

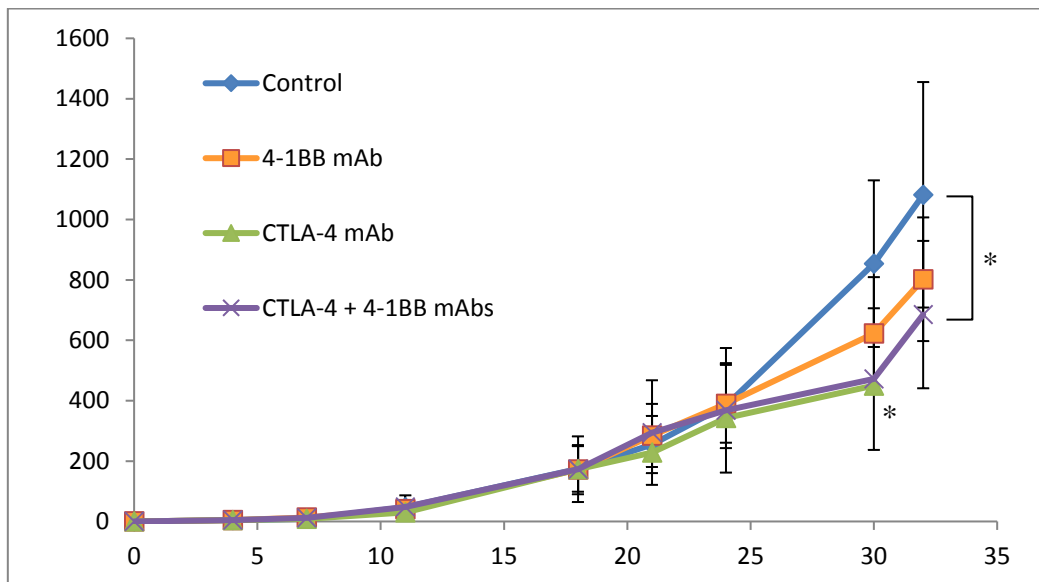


Figure 35 : Efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4, de l'anti-4-1BB ou de la combinaison des deux chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1. Chaque point représente la moyenne des volumes tumoraux des 7 animaux du groupe le jour de la mesure et les barres d'erreur, l'écart type correspondant. Le premier traitement a eu lieu à D18 avec un volume tumoral moyen de 174, 172,9, 171,6 et 173,1 respectivement pour les groupes contrôles, anti-CTLA-4, anti-4-1BB et la combinaison de ces 2 anticorps. D0 représente l'injection des cellules tumorales. Les mesures au-delà de D30 ne sont pas représentées pour l'anti-CTLA-4 car une partie des animaux est décédée suite au dernier traitement (86%, soit 6 animaux sur 7). Les données ont été analysés statistiquement par un test de Tukey (* $p \leq 0,05$).

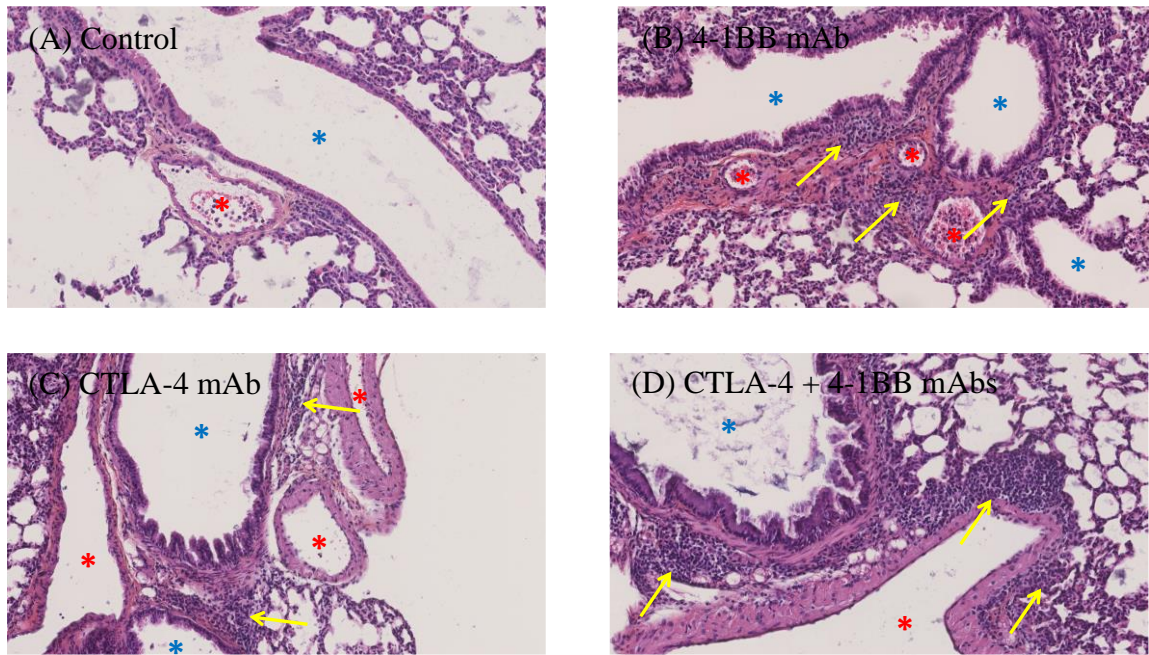


Figure 36 : Photographies représentatives d'infiltrations lymphocytaires pulmonaires chez des souris porteuses de tumeurs 4T1 et traitées à l'anti-CTLA-4 et/ou l'anti-4-1BB. Les scores attribués sont compris entre 0 (pas d'infiltrat) et 3 (infiltrat lymphocytaire massif). Les scores correspondant aux photographies sont représentatifs des 7 animaux de chaque groupe et sont les suivants : A=0 ; B=1 ; C=1 ; D=3. Les étoiles bleues représentent les bronches et les étoiles rouges, les vaisseaux sanguins. Les flèches jaunes ciblent les infiltrations de lymphocytes. Ces photographies ont été prises à un grossissement x200 de lames de poumons inclus en paraffine, portant des coupes de 5 μ m d'épaisseur et traitées par une coloration HE.

Concernant l'anticorps anti-CTLA-4, il n'y a pas de différence significative sur le poids des rates entre les groupes contrôle et monothérapie comme indiqué par la **Figure 37**. En revanche, l'anticorps anti-4-1BB induit une diminution significative par rapport à l'anti-CTLA-4 et cette diminution est retrouvée dans le groupe combiné. En conclusion, les cellules colonisant la rate n'ont sans doute pas d'impact sur l'efficacité des traitements puisque la combinaison et l'anti-CTLA-4 seul présentent le même effet anti-tumoral mais avec des rates de taille significativement différente. En revanche, la différence entre ces 2 groupes réside dans leur toxicité et étant donné que l'anti-CTLA-4 seul induit un taux de mortalité important contrairement à la combinaison, il pourrait être possible que les cellules présentes dans la rate des animaux de ce groupe en soient responsables. Une caractérisation des populations leucocytaires spléniques est là aussi nécessaire pour aller plus loin. Dans tous les cas, l'anti-4-1BB induit des changements significatifs dans la réponse immunitaire à l'anti-CTLA-4 qui

impactent les populations cellulaires de la rate et qui sont bénéfiques de manière générale pour l'animal.

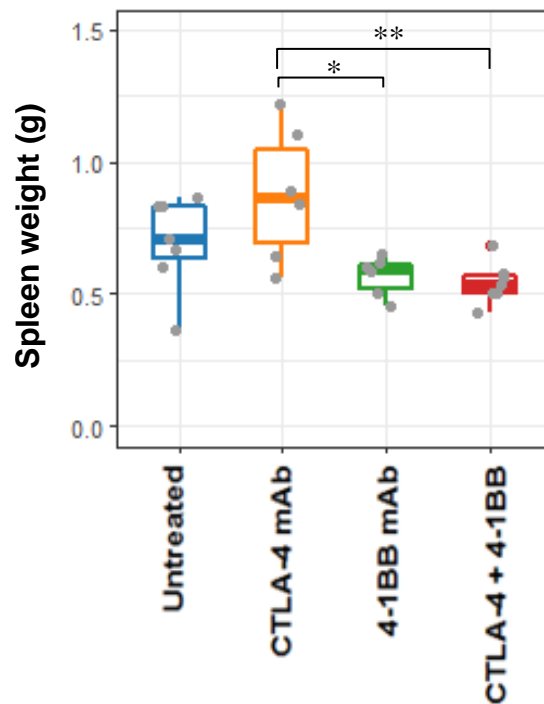


Figure 37 : Effets de l'anti-CTLA-4, de l'anti-4-1BB et de la combinaison des deux sur le poids des rates de souris porteuses de tumeurs 4T1. Les valeurs individuelles des 7 animaux de chaque groupe sont représentées par les points gris. Les rectangles représentent l'écart interquartile et les barres horizontales, la médiane. Les barres verticales représentent les premiers et 99^{ème} centiles et toute valeur au-delà de ces « moustaches » est considérée comme exceptionnelle. Les données ont été analysées statistiquement par un test de Tukey (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Enfin, la **Figure 38** démontre que les émissions très importantes de cytokines induites par l'anticorps anti-CTLA-4 sont fortement diminuées lorsqu'il est combiné à l'anticorps anti-4-1BB qui a un profil cytokinique moindre. Le groupe traité avec l'anticorps anti-CTLA-4 confirme l'hypothèse du *cytokine storm* comme cause de la mortalité induite suite aux dernières injections. Tout comme les 2 anticorps précédents, la modulation générale des signaux apportée par la combinaison, y compris au niveau des cytokines anti-tumorales, est bénéfique et implique, de manière logique, qu'une maîtrise des signaux aboutit à des effets plus efficaces qu'un emballement du système immunitaire associé à un profil cytokinique anarchique.

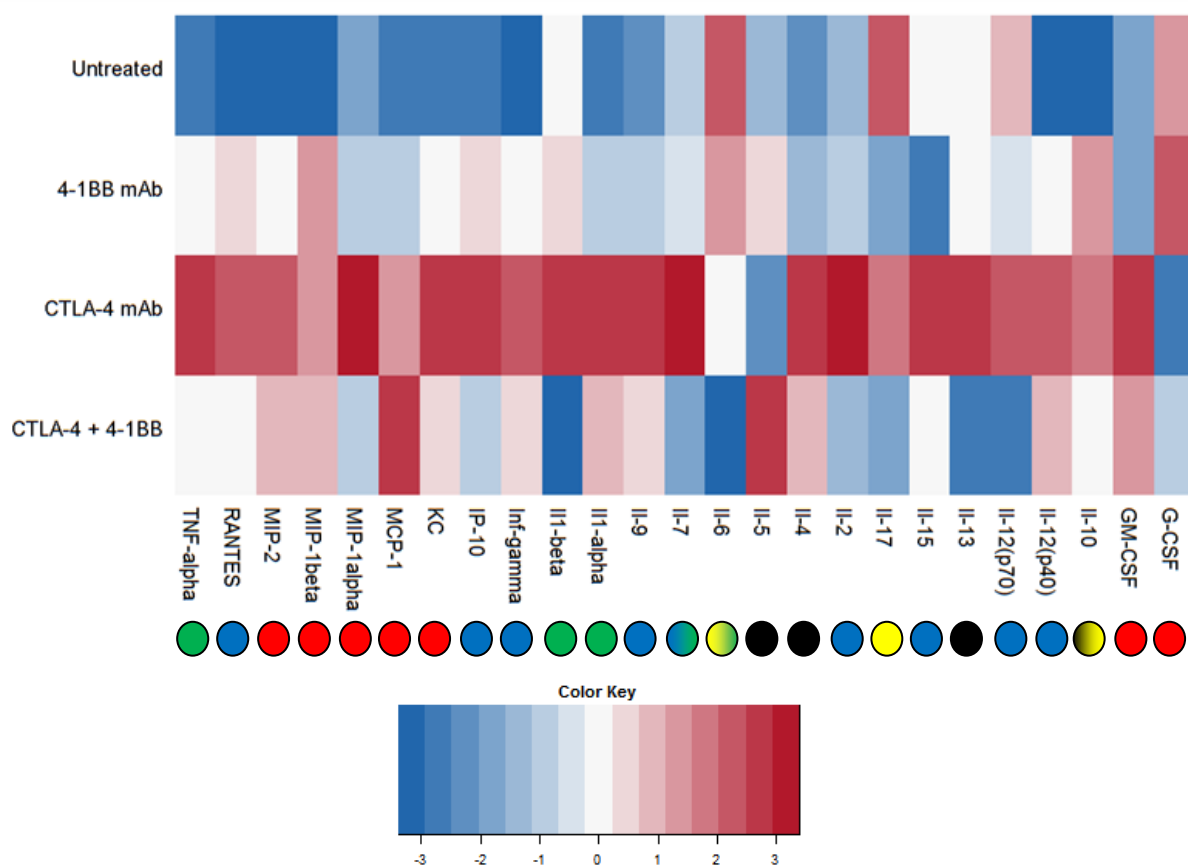


Figure 38 : Comparaison des taux de cytokines et chimiokines circulantes chez des souris porteuses de tumeur 4T1 et traitées à l’anti-CTLA-4 et/ou à l’anti-4-1BB. Les données Luminex® (en pg/mL) ont été obtenues suite à des prélèvements sanguins à D32 sur les 7 animaux de chaque groupe. Elles ont tout d’abord été normalisées par rapport au groupe contrôle via la formule suivante : $\log((\text{valeur} - \text{moyenne}_{\text{contrôle}}) / \text{moyenne}_{\text{contrôle}})$. Un z-score a ensuite été calculé à partir des valeurs normalisées, permettant de mettre en évidence l’écart par rapport à la moyenne des dosages de cytokines pour chaque rangée. Les écarts positifs tendent vers le rouge, les écarts négatifs vers le bleu comme représenté dans la légende en bas de figure. Les points de couleur indiquent le rôle principal de chaque cytokine : rouge = cellules myéloïdes ; bleu = réponse Th1 ; noir = réponse Th2 ; jaune = réponse Th17 ; vert = réponse pro inflammatoire. Certaines cytokines peuvent présenter plusieurs rôles ce qui se traduit par 2 couleurs pour un même point.

3.3. Comparaison des effets de la combinaison anti-4-1BB/anti-PD1 dans 2 modèles de tumeur mammaire murine : 4T1 versus EMT-6

4T1 et EMT-6 sont 2 modèles d’origine mammaire mais dont leur comportement vis-à-vis de l’anticorps anti-PD1 est différent. En effet, comme décrit précédemment *via* la

Figure 17 notamment, 4T1 est résistant au traitement avec l'anticorps anti-PD1 tandis qu'EMT-6 y répond de manière significative. De plus, la mortalité observée pour le modèle 4T1 suite aux différents traitements suggère que les tumeurs induisent une certaine réaction immunitaire chez les animaux typique de ce modèle qui n'est pas retrouvée dans le modèle EMT-6. Il est important de souligner que ces deux modèles ne se développent pas dans le même microenvironnement puisque les cellules 4T1 sont injectées dans la graisse mammaire tandis que les cellules EMT-6 sont injectées sous la peau et que cela peut avoir un impact sur la réponse aux traitements. Toutefois, afin de mettre en lumière ces différences de réponse entre ces 2 modèles, des analyses comparatives ont été effectuées comme décrit ci-dessous, entre les monothérapies à l'anticorps anti-PD1, anti-4-1BB ou leur combinaison.

3.3.1. Efficacité anti-tumorale

L'efficacité de ces traitements sur la croissance tumorale des modèles EMT-6 et 4T1 est présentée par la **Figure 39** (rappel de la **Figure 27** pour 4T1).

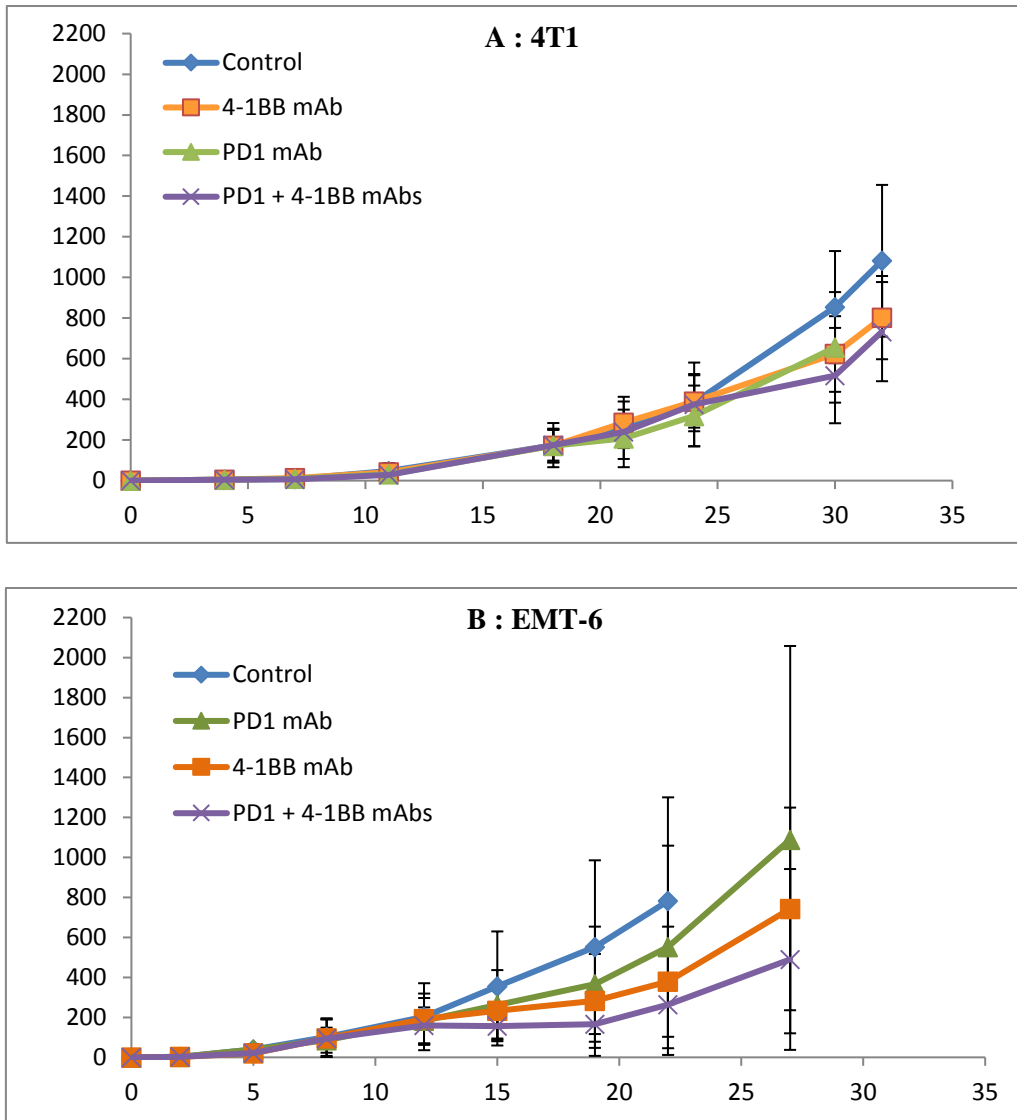


Figure 39 : Efficacité anti-tumorale de l'anti-PD1, de l'anti-4-1BB ou de la combinaison des deux chez des animaux porteurs de tumeurs 4T1 (A) ou EMT-6 (B). Chaque point représente la moyenne des volumes tumoraux des 7 animaux du groupe le jour de la mesure et les barres d'erreur, l'écart type correspondant. Pour 4T1 (A), le premier traitement a eu lieu à D18 avec un volume tumoral moyen de 174, 172,4, 171,6 et 174,7 respectivement pour les groupes contrôle, anti-PD1, anti-4-1BB et la combinaison de ces 2 anticorps. Les mesures au-delà de D30 ne sont pas représentées pour le groupe traité à l'anti-PD1 car une partie des animaux est décédée suite au dernier traitement (29%, soit 2 animaux sur 7). Pour EMT-6 (B), le premier traitement a eu lieu à D9 avec un volume tumoral moyen de 101,3, 85,8, 95,2 et 93,7 respectivement pour les groupes contrôle, anti-PD1, anti-4-1BB et la combinaison de ces 2 anticorps. Les mesures du groupe contrôle ne sont pas représentées au-delà de D22 car une partie des animaux a été euthanasiée pour dépassement des critères éthiques de volume

tumoral. Pour les 2 modèles, D0 représente l'injection des cellules tumorales. Les données ont été analysées statistiquement par un test de Tukey.

Si l'efficacité des traitements semble bien plus marquée dans le modèle EMT-6 que dans le modèle 4T1, ils ne sont en revanche pas significatifs sur l'ensemble des groupes dans cette expérience, y compris pour l'anti-PD1 contrairement à ce qui a été présenté précédemment (cf. **Figure 17**). Comme attendu, une analyse plus détaillée révèle que l'évolution tumorale des animaux d'un même groupe est très hétérogène et varie d'une réponse complète avec une absence de tumeur macroscopiquement visible à la fin des traitements à une absence totale de réponse dans un même groupe. Malgré cela, l'anticorps anti-4-1BB semble être plus efficace que l'anticorps anti-PD1 dans le modèle EMT-6 alors que ce dernier se révélait moins intéressant sur 4T1. De plus, la combinaison des 2 traitements semble induire un effet synergique important avec une diminution de la vitesse de croissance tumorale.

3.3.2. Profils cytokiniques

Au sein des groupes traités, il existe des sous-groupes qu'il est possible de qualifier comme répondeurs ou non répondeurs. Les analyses des profils cytokiniques exposées précédemment démontrent des variations importantes dans l'expression de certaines de ces cytokines mais sans prendre en compte les sous-groupes répondeurs/non répondeurs. La réponse aux ICI a été décrite comme très dépendante des individus. De façon arbitraire, il a été convenu de définir les critères permettant d'inclure un animal dans le groupe répondeur ou non répondeur à un même traitement afin de comparer les effets des cytokines sur les deux modèles testés. La différence entre répondeurs et non répondeurs a été déterminée en utilisant les valeurs de volume tumoral relatif (Relative Tumor Volume, RTV) défini comme étant le volume tumoral de l'animal à la fin de l'expérience divisé par le volume tumoral au début des traitements. Le RTV minimal du groupe contrôle a été utilisé pour séparer les animaux non répondeurs (avec un RTV supérieur) et répondeurs (avec un RTV inférieur). Afin de mettre en évidence les cytokines d'intérêt dans la masse d'information obtenue par leur dosage, les **Figures 40 et 41** présentent les profils d'expression cytokiniques obtenus par soustraction des valeurs des animaux non répondeurs aux animaux répondeurs, respectivement pour les modèles 4T1 et EMT-6. Les analyses ont été effectuées distinctement et le code couleur des deux figures ne correspond pas à la même échelle. Les valeurs faibles révèlent des cytokines

théoriquement pro tumorales puisque surexprimées de manière importante chez les animaux non répondeurs et vice versa.

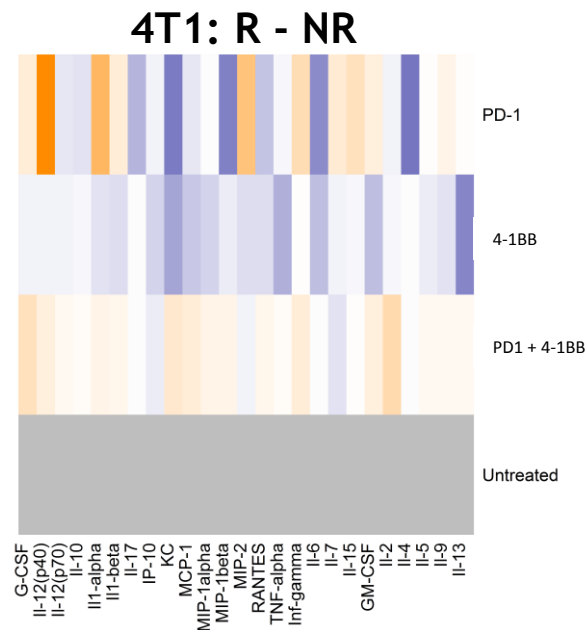


Figure 40 : Profils d'expressions cytokiniques « répondeurs moins non répondeurs » dans le modèle 4T1. Les données Luminex® (en pg/mL) ont été obtenues suite à des prélèvements sanguins à D32 sur les 7 animaux de chaque groupe. Elles ont tout d'abord été normalisées par rapport au groupe contrôle via la formule suivante : $\log(\text{valeur}/\text{moyenne}_{\text{contrôle}})$. Un z-score a ensuite été calculé à partir des valeurs normalisées, permettant de mettre en évidence l'écart par rapport à la moyenne des dosages de cytokines tous groupes confondus pour chaque rangée. Le z-score moyen des animaux non répondeurs est enfin soustrait au z-score moyen des animaux répondeurs. Les cases bleues indiquent que la valeur moyenne des répondeurs est inférieure à la valeur moyenne des non répondeurs. Les cases orange indiquent que la valeur moyenne des répondeurs est supérieure à la valeur moyenne des non répondeurs. Les cases blanches indiquent que les valeurs moyennes des répondeurs et des non répondeurs sont égales. Les groupes contrôles sont représentés en gris car par définition il n'y a pas de répondeurs. R = répondeur ; NR = non répondeur.

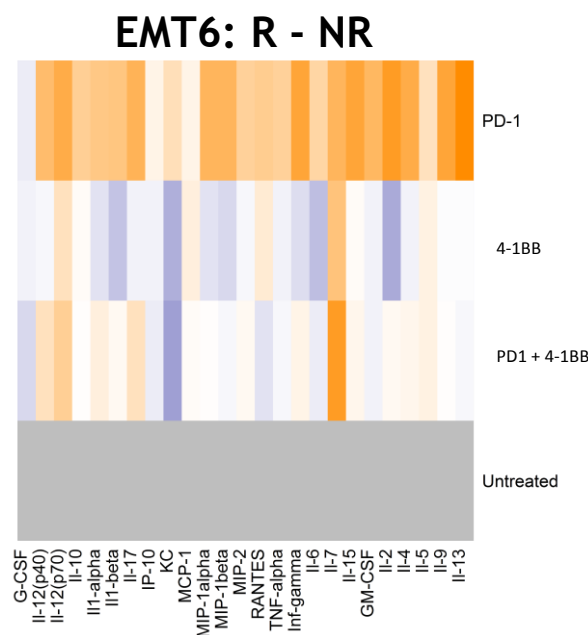


Figure 41 : Profils d'expressions cytokiniques « répondeurs moins non répondeurs » dans le modèle EMT-6. Les données Luminex® (en pg/mL) ont été obtenues suite à des prélèvements sanguins à D27 sur les 10 animaux de chaque groupe. Elles ont tout d'abord été normalisées par rapport au groupe contrôle via la formule suivante : $\log(\text{valeur}/\text{moyenne}_{\text{contrôle}})$. Un z-score a ensuite été calculé à partir des valeurs normalisées, permettant de mettre en évidence l'écart par rapport à la moyenne des dosages de cytokines tous groupes confondus pour chaque rangée. Le z-score moyen des animaux non répondeurs est enfin soustrait au z-score moyen des animaux répondeurs. Les cases bleues indiquent que la valeur moyenne des répondeurs est inférieure à la valeur moyenne des non répondeurs. Les cases orange indiquent que la valeur moyenne des répondeurs est supérieure à la valeur moyenne des non répondeurs. Les cases blanches indiquent que les valeurs moyennes des répondeurs et des non répondeurs sont égales. Les groupes contrôles sont représentés en gris car par définition il n'y a pas de répondeurs. R = répondeur ; NR = non répondeur.

Dans chacun des deux modèles, l'anticorps anti-PD1 seul est le traitement qui induit les réponses cytokiniques les plus marquées. Plus précisément, concernant le modèle 4T1, les animaux non répondeurs émettent d'importants taux de cytokines IL-4, IL-6, MIP-1 β et KC principalement qui sont liées aux cellules myéloïdes (MIP-1 β et KC), à la réponse pro tumorale Th2 (IL-4) et à la réponse Th17/pro inflammatoire (IL-6). Quant aux animaux répondeurs, ils émettent plutôt de l'IL-12(p40), de l'IL-1 α et du MIP-2 orientées vers la réponse anti-tumorale Th1 (IL-12), inflammatoire (IL-1) et myéloïde (MIP-2). Les cytokines phares de la réponse anti-tumorale comme l'IL-2 et l'IFN γ sont produites par les animaux

répondeurs mais de manière modérée. Ces profils d'expression cytokinique sont cohérents mais restent difficiles à interpréter tant les mécanismes mis en jeu sont complexes et pas encore tous très bien décrits. Pour le modèle EMT-6, ce même anticorps produit un relargage massif de presque toutes les cytokines dosées chez les animaux répondeurs. Sachant que pour ce modèle, l'activité anti-tumorale de l'anticorps anti-PD1 reste marginale, il est possible que les effets pro et anti-tumoraux soient tous deux activés entraînant donc une réponse immunitaire désorganisée.

En ce qui concerne le traitement avec l'anticorps anti-4-1BB, une production plus importante de cytokines est observée chez les animaux non répondeurs comparée au modèle 4T1. L'absence d'efficacité de ce traitement est donc corrélée à l'absence de signaux Th1 anti-tumoraux et à une prépondérance des signaux pro inflammatoires et pro tumoraux (IL-13, IL-6, TNF- α ...). Comme observé précédemment dans le modèle EMT-6, le traitement à l'anticorps anti-4-1BB produit des réponses plus hétérogènes, avec des animaux répondeurs produisant de l'IL-12(p70), du MCP-1, du RANTES, de l'IL-7 et de l'IL-5 orientés vers un contexte plutôt anti-tumoral dominé par l'IL-12, RANTES et l'IL-7. De manière surprenante, l'IL-5 dont le rôle est plutôt pro tumoral est surexprimée chez les répondeurs par rapport aux non répondeurs. De la même manière, l'IFN- γ et l'IL-2 sont surexprimées chez les non répondeurs. Ceci reflète la complexité de la réponse du système immunitaire où chaque cytokine fait partie d'un ensemble dont chaque élément ne peut être pour l'instant analysé de manière isolée.

Il est en revanche remarquable que le traitement combinant les anticorps anti-4-1BB et anti-PD1 produise des réponses modulées en comparaison à la monothérapie avec l'anticorps anti-PD1 seul. Dans le modèle 4T1, les animaux non répondeurs ne semblent pas exprimer de cytokines de manière importante. En revanche, les animaux répondeurs émettent de nombreuses cytokines en quantités mesurées mais dont l'orientation est clairement Th1 (IL-2, IFN- γ , RANTES, IL-12) et myéloïde (G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α et β , MIP-2, MCP-1, KC). Dans les deux cas, la combinaison module le relargage des cytokines. Dans le modèle EMT-6, la combinaison induit un effet anti-tumoral légèrement synergique et oriente les émissions de cytokines vers une réponse Th1 (IL-7, IL-12), inflammatoire (IL-7, IL-1 α) et Th17 (IL-17). L'IFN- γ est très peu exprimé et l'IL-2 pas du tout. Les animaux non répondeurs semblent s'orienter vers une réponse myéloïde avec surexpression de G-CSF et KC.

Pour conclure, les deux modèles étudiés présentent un profil cytokinique totalement différent vis-à-vis des traitements aux ICI administrés. Cela se traduit par une résistance dans le modèle 4T1 et une certaine sensibilité dans le modèle EMT-6. De manière intéressante, la combinaison avec l'anticorps anti-4-1BB réoriente la réponse vers une organisation immunitaire plus efficace engendrant une meilleure efficacité dans le modèle EMT-6 et une diminution de la toxicité dans le modèle 4T1.

4. Conclusions et perspectives

4.1. La réponse est individu-dépendante

Il a été démontré ici que l'efficacité des ICI est réelle mais, comme en clinique, elle varie en fonction des cancers et des individus. Leur toxicité est soumise également aux mêmes variables, ce qui soutient le besoin de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des ICI. Concernant l'activité anti-tumorale, il est nécessaire d'identifier les voies d'inhibition du système immunitaire activées par la tumeur pour permettre son développement, et ainsi guider le choix de l'anticorps à prescrire. Plusieurs études évoquent par exemple la possibilité d'utiliser l'antigène PD-L1 comme biomarqueur, dans la mesure où son expression par les cellules tumorales (comme 4T1 [44]) et/ou par les cellules immunitaires infiltrées dans la tumeur a été identifiée comme facteur de mauvais pronostic [16, 53]. Toutefois, l'antigène PD-L1 est une molécule dont l'expression est dynamique et inductible et, selon certaines études, il faudrait utiliser cette information comme un indicateur relatif de la probabilité de réponse plutôt que comme biomarqueur prédictif de réponse ou non réponse [54, 55].

L'efficacité de ces traitements est généralement corrélée à une proportion plus importante de lymphocytes T effecteurs que de lymphocytes T régulateurs ayant infiltré la tumeur. Toutefois, dans certains cas ces deux éléments ne sont pas liés, suggérant l'implication d'autres populations cellulaires qui ne sont pas étudiées ici, telles que les macrophages M1, les lymphocytes NK, etc. Ces cellules ont un rôle certainement non négligeable dans la réponse anti-tumorale et il serait intéressant d'investiguer aussi ces voies thérapeutiques. De la même manière, sans augmenter la population de lymphocytes effecteurs, la réponse immunitaire peut apparaître par diminution des cellules immunosuppressives. Une baisse de l'infiltration de T régulateurs bien entendu mais aussi une baisse de la quantité de MDSCs et/ou de macrophages M2 peuvent constituer un objectif de traitement. Ces populations immunitaires doivent être étudiées mais il est nécessaire de garder à l'esprit qu'observer le comportement de tous ces types cellulaires nécessite une capacité d'analyse très importante. De plus, en lien avec le paragraphe précédent sur les biomarqueurs, certaines tumeurs sont plus immunogènes que d'autres, ce qui provoque, chez certains patients, une augmentation naturelle du *ratio* Teff/Treg intratumoral avant tout traitement. Ces tumeurs seraient ainsi théoriquement plus sensibles aux immunothérapies étant donné que les cellules effectrices sont déjà sur place et qu'il manque une stimulation pour enclencher le processus de réponse immunitaire. C'est le cas ici pour CT26 qui est plus immunogène que

4T1 et EMT-6 et qui est particulièrement sensible à l'anti-CTLA-4. Aussi, il a été décrit que l'infiltration de certaines populations de cellules immunitaires dans la tumeur peut être de bon ou mauvais pronostic selon le type cellulaire étudié et notamment qu'un *ratio* Teff/Treg est corrélé à une meilleure survie des patients [56].

4.2. Analyses complémentaires

Concernant ces analyses de cytométrie en flux, elles permettent de quantifier des populations cellulaires. En revanche, elles ne permettent pas de connaître leur localisation précise au sein de la tumeur. Or, ce paramètre est de plus en plus étudié et rentre notamment en compte dans le calcul de l'immunoscore dans le cancer du colon permettant de prédire l'évolution clinique de la maladie [57]. Il est ainsi envisagé, dans la suite de ce projet, d'étudier la localisation des lymphocytes infiltrant la tumeur *via* des analyses immunohistochimiques d'échantillons inclus en paraffine, afin de corrélérer ou non la réponse au traitement avec une infiltration de lymphocytes T effecteurs au cœur des tumeurs et/ou dans la marge d'invasion.

Des analyses histologiques complémentaires sur ces mêmes échantillons pourraient permettre d'identifier la présence d'autres populations de cellules immunitaires au sein des tumeurs. Les phénotypes découverts pourraient ainsi être corrélés à un effet anti-tumoral ou non selon leur polarisation anti-tumorale Th1 (lymphocytes NK, macrophages M1 par exemple) ou pro tumorale Th2 (macrophages M2). Sur les échantillons de rate collectés, il serait également intéressant de caractériser les populations qu'ils contiennent, notamment pour le modèle 4T1 qui induit naturellement une splénomégalie et chez qui les traitements pourraient modifier qualitativement et quantitativement leur contenu. La mortalité observée peut être associée à des cellules myéloïdes dont certains phénotypes sont associés à une production importante de cytokines et ces analyses pourraient donc participer à la compréhension des mécanismes mis en jeu. Enfin, parmi les cytokines dosées dans ce projet, plusieurs sont liées aux cellules myéloïdes. Cette catégorie recouvre un si grand nombre de phénotypes avec des rôles très différents qu'il s'avère difficile d'interpréter précisément ces données. Une surreprésentation d'un phénotype particulier identifiée par immunohistochimie ou cytométrie en flux pourrait permettre d'orienter plus finement les hypothèses.

Concernant le choc cytokinique, il a été démontré dans le modèle 4T1 que les monothérapies ciblant PD1/PD-L1 et CTLA-4 provoquent des émissions massives de cytokines conduisant probablement à la mort des animaux. Une analyse plus précise avec un

plus grand nombre d'animaux et des outils informatiques adaptés permettra de corrélérer tous ces résultats. Il a également été identifié que les traitements efficaces combinant un ICI et l'anti-4-1BB ne sont pas forcément associés à une production massive d'IL-2 ou d'IFN- γ qui sont des molécules fortement impliquées dans la réponse anti-tumorale, contrairement à ce qui pouvait être attendu. Ces anticorps induisent la production d'un cocktail de cytokines particulier dont certaines sont pourtant parfois associées à une réponse Th2 mais qui aboutit finalement, le plus souvent, à un effet synergique des deux molécules. Toutes les cytokines dosées ne sont pas aussi bien caractérisées que l'IL-2 et la complexité du système immunitaire rend, encore une fois, l'interprétation de toutes ces données difficile. Enfin, uniquement un dosage en fin d'expérience a été réalisé ici. Il est envisagé par la suite de doser ces mêmes cytokines à plusieurs temps au cours des expériences afin d'établir une cinétique d'expression de chaque molécule, ce qui pourrait aider également à la compréhension des processus impliqués.

4.3. Développement de combinaisons

De nombreux essais de combinaisons associant plusieurs ICI ou un ICI et un autre type de thérapie ont déjà été réalisés mais sont souvent associés à une accumulation des effets indésirables. Dans ce projet, le développement de combinaisons avait pour but à la fois de dépasser les résistances de la tumeur 4T1 vis-à-vis des monothérapies ciblant les voies CTLA-4 et PD1/PD-L1 et à la fois de diminuer la toxicité des traitements entraînant la mort de certains animaux. Ces deux problématiques existent également chez les patients. L'anticorps anti-4-1BB a donc un réel intérêt puisqu'il a été démontré qu'il diminue fortement la mortalité induite par les anticorps anti-CTLA-4, anti-PD1 et anti-PD-L1 par une modulation de la réponse immunitaire et permet donc de les rendre efficaces. Les dosages des cytokines révèlent en effet que les relargages massifs de cytokines engendrés par les monothérapies aboutissent à un choc anaphylactique qui ne se produit pas lorsque l'anticorps anti-4-1BB est administré en combinaison.

Peu d'études ont été publiées concernant le checkpoints immunitaire 4-1BB, mais les essais cliniques passés ont démontré que les anticorps testés étaient moyennement efficaces en induisant au mieux une stabilisation de la maladie. A noter également que l'anti-4-1BB PF-050822566 n'a provoqué aucun effet indésirable durant un essai de phase I [58]. Ces éléments sont en accord avec les observations précédentes, à savoir un effet non significatif du traitement en monothérapie associé à une absence d'effets secondaires dans le modèle 4T1.

Comme démontré dans ce mémoire, certains patients traités aux ICI développent des réactions auto-immunes qui, dans la plupart des cas, conduisent à l'arrêt des traitements pour revenir vers des thérapies plus conventionnelles. La combinaison avec l'anticorps anti-4-1BB qui, comme observé précédemment, module la réponse immunitaire aux ICI, pourrait permettre de prolonger ces traitements au lieu de les arrêter. De plus, dans l'un des deux modèles étudiés, il a été montré un effet synergique avec cet anticorps. Il pourrait donc être également envisager de combiner un ICI avec l'anticorps anti-4-1BB en traitement de première intention. De manière intéressante, dans le cas d'un effet modulateur de la réponse immunitaire sur les effets secondaires amenant à l'arrêt des traitements, l'activité anti-tumorale, quant à elle, n'est pas modulée.

Ces expériences devront être répétées afin de confirmer ces premiers résultats. Ils pourront alors peut-être participer à l'élaboration d'un rationnel en vue d'un essai clinique dont le but serait de mettre en évidence les bénéfices apportés par un anticorps anti-4-1BB chez des patients présentant des effets secondaires liés à l'immunité, de gravité 3 ou 4, et sur le point d'abandonner le traitement à l'anti-PD1. Par la suite, il pourrait également être envisagé de comparer l'efficacité de l'anticorps anti-PD1 seul et de la combinaison anti-PD1 et anti-4-1BB dans une nouvelle cohorte de patients.

4.4. Caractérisation des modèles précliniques en réponse aux traitements d'ICI

Les succès cliniques rencontrés par les thérapies visant CTLA-4 et PD1 ont rapidement et depuis plusieurs années ouvert une nouvelle voie thérapeutique ciblant les checkpoints immunitaires et constituent une avancée scientifique majeure dans le traitement des cancers. De ces succès s'en est suivie une prise de conscience générale de la part des oncologues et biologistes sur le potentiel thérapeutique du système immunitaire endogène qui s'est traduite par un engouement important autour de ces thématiques. Aujourd'hui, les molécules étudiées représentent une fraction mineure de la myriade de récepteurs et de ligands qui sont autant de cibles potentielles permettant de restaurer la réponse immunitaire face au développement de la maladie. Les opportunités sont donc nombreuses mais chaque patient, chaque cancer et chaque système immunitaire est unique et, dans l'ère de la médecine personnalisée, l'étude préalable de chaque cas est primordiale y compris en immunothérapie. Aussi, la majorité des patients traités par des monothérapies présente une régression tumorale partielle, suggérant la mise en place de mécanismes de résistance qui pourraient s'avérer

dramatiques [59]. D'autres développent des réactions auto-immunes liées aux immunothérapies et doivent interrompre les traitements prescrits.

Dans ce contexte, il est crucial de disposer de modèles précliniques validés et caractérisés en immunothérapie afin de pouvoir déceler, anticiper et surmonter ces obstacles le plus tôt possible dans le développement des nouvelles molécules. C'est dans cette démarche qu'un projet de plus grande ampleur a été entamé au sein d'Oncodesign auquel les travaux présentés ici ont participé. Le **Tableau 11** présente l'avancement de ce projet dont le but est d'évaluer la sensibilité d'un certain nombre de modèles à différents ICI.

Tableau 11 : Résumé de la sensibilité aux ICI de différents modèles. *Les valeurs de T/C indiquées s'expriment en pourcentages. Elles ont été calculées comme décrit en page 52 pour les modèles sous cutanés. Pour les modèles de survie (*), les valeurs de T/C sont obtenues en divisant la médiane de survie (en jours) du groupe traité par la médiane de survie du groupe contrôle. Une valeur de T/C supérieure à 125% démontre un effet significatif du traitement traduisant une survie plus longue des animaux traités comparativement aux animaux contrôles. « n » indique le nombre d'études prises en compte pour le calcul des valeurs de T/C. Le site de greffe est sous cutané (SC) ou orthotopique (OT). Le code couleur est le suivant : Rouge = T/C > 80% (ou <125%*), Orange = 42% < T/C < 80%, Vert = TC < 42% (ou >125%*) et Blanc = Non Applicable (NA). GITR = Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein.*

Modèle			CTLA-4		PD1		PD-L1		OX40		4-1BB		GITR	
Nom	Site	Type	n	T/C	n	T/C	n	T/C	n	T/C	n	T/C	n	T/C
4T1	OT	Sein	8	81	13	102	3	104	1	121	1	65	0	NA
A20	SC	Lymph B	2	53	2	34	1	59	0	NA	0	NA	0	NA
B16-F10	SC	Mélanome	3	100	5	80	2	121	0	NA	0	NA	0	NA
C38	SC	Colon	3	0	2	18	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
CT26	SC	Colon	8	22	18	72	9	66	1	112	0	NA	4	16
EMT6	SC	Mammaire	12	3	17	54	2	77	2	36	1	58	1	61
EMT6	OT	Mammaire	0	NA	1	68	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
HEPA1-6*	OT	Foie	2	27	1	191	0	NA	0	NA	1	22	0	NA
LLC	SC	Poumon	2	121	2	97	1	88	1	108	0	NA	0	NA
MBT2*	OT	Vessie	1	260	3	149	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
MBT2	SC	Vessie	1	83	3	73	2	66	1	65	0	NA	0	NA
Renca*	OT	Rein	1	100	1	100	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
Renca	SC	Rein	0	NA	1	61	0	NA	1	65	0	NA	0	NA
PAN02	SC	Pancreas	1	5	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA

Ce tableau permet de rapidement se rendre compte que l'efficacité de chaque ICI dépend de la tumeur et que le choix du traitement est très important même s'ils ont tous la même finalité, restaurer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Ces données représentent déjà un travail long et coûteux qu'il faut poursuivre afin d'étoffer les connaissances en immunothérapie qui feront gagner du temps et favoriseront le développement des nouvelles générations d'inhibiteurs de checkpoints immunitaires plus efficaces. Une analyse approfondie révélera de plus que la sensibilité générale aux ICI de chaque modèle est corrélée à son degré de mutations comme l'indique la **Figure 42**.

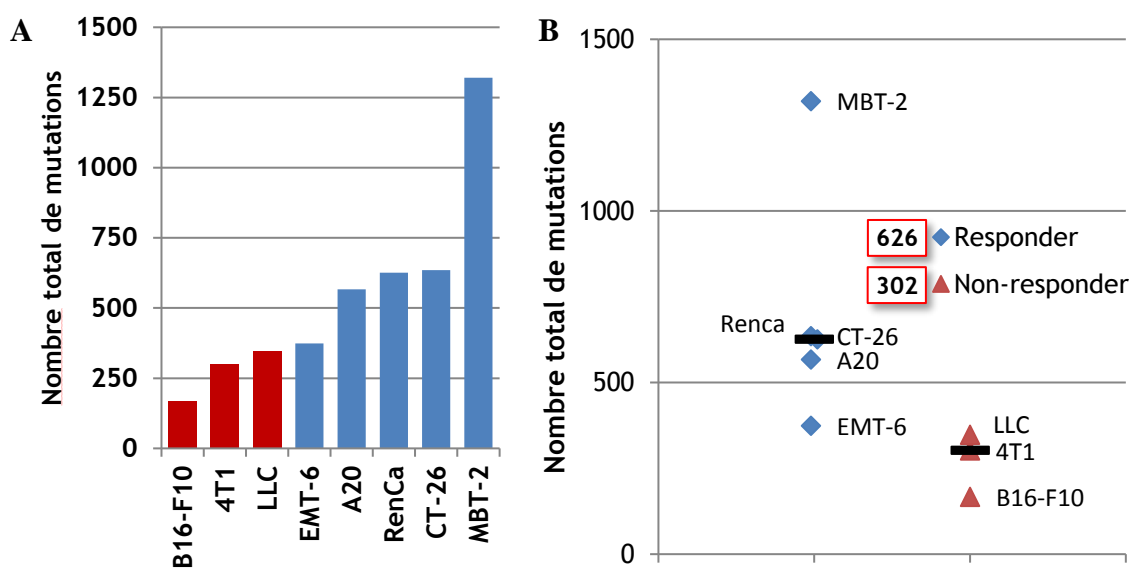


Figure 42 : Corrélation entre la sensibilité aux ICI ciblant la voie PD1/PD-L1 et le taux de mutations. A : nombre de mutations présentes dans chaque lignée cellulaire. Ce nombre a été déterminé suite au séquençage des différents exomes. Les histogrammes rouges correspondent aux modèles non répondeurs ($T/C > 80\%$) et les bleus aux modèles répondeurs ($T/C < 80\%$). Cette limite de 80% a été choisie arbitrairement et uniquement pour les modèles SC. B : Nombre de mutations retrouvées dans les modèles répondeurs et non répondeurs. Le nombre encadré en rouge correspond au nombre d'animaux total traité par les anticorps anti-PD1 ou anti-PD-L1 tous modèles confondus répondeurs et non répondeurs. Les barres noires horizontales représentent la médiane du nombre de mutations dans les deux groupes.

Cette figure révèle en effet que concernant la voie PD1/PD-L1, les modèles présentant peu de mutations sont moins prédisposés à répondre au traitement. Ceci peut s'expliquer par le fait que les mutations engendrent l'apparition de nouveaux antigènes spécifiques de la

tumeur que le système immunitaire de l'hôte est capable de reconnaître et donc capable de considérer la lésion comme du non soi. Il pourrait ainsi être envisagé d'évaluer le degré de mutation des cellules tumorales des patients pour prédire la probabilité de réponse au traitement ciblant les checkpoints immunitaires une fois qu'un modèle serait bien établi.

Bibliographie

1. HANAHAN D, WEINBERG RA, The hallmarks of cancer. *Cell*, 7 Janvier 2000, 100(1):55-70.
2. HANAHAN D, WEINBERG RA, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 4 Mars 2011, 144(5):646-74.
3. CORTHAY A, Does the immune system naturally protect against cancer?, *Frontiers in immunology*, 12 Mai 2014, 5:197.
4. DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, Aout 2004, Vol. 21, 137-148.
5. MITTAL D, GUBIN MM, SCHREIBER RD, SMYTH MJ, New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, Avril 2014, 27:16-65.
6. CHEN DS, MELLMAN I, Oncology meets immunology: The cancer immunity cycle. *Immunity*, 25 Juillet 2013, 39(1):1-10.
7. KOEBEL CM, VERMI W, SWANN JB, ZERAFI N, RODIG SJ, OLD LJ, SMYTH MJ, SCHREIBER RD, Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 6 Décembre 2007, 450:903-907.
8. SHORE ND, Advances in the understanding of cancer immunotherapy. *BJU International*, 2015, 116:321-329.
9. BEATTY GL, GLADNEY WL, Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 15 Février 2015, 21(4):687-692.

10. PENNOCK GK, CHOW LQM, The evolving role of immune checkpoint inhibitors in cancer treatment. *The Oncologist*, Juillet 2015, 20(7):812-822.
11. HE Y, QIAN H, LIU Y, DUAN L, LI Y, SHI G, The roles of regulatory B cells in cancer. *Journal of immunology research*, 2014, 2014:215471.
12. NAMM JP, LI Q, LAO X, LUBMAN DM, HE J, LIU Y, ZHU J, WEI S, CHANG AE, B lymphocytes as effector cells in the immunotherapy of cancer. *Journal of surgical oncology*, 15 Mars 2012, 105(4):431-435.
13. WESOLOVSKI R, MARKOWITZ J, CARSON 3RD WE, Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *Journal for immunotherapy of cancer*, 15 Juillet 2013, 2013;1:10.
14. TRIKHA P, CARSON 3RD WE, Signaling pathways involved in MDSC regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, Aout 2014, 1846(1):55-65.
15. PARDOLL DM, The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, Avril 2012, 12:252-264.
16. SHARON E, STREICHER H, GONCALVES P, CHEN HX, Immune checkpoint inhibitors in clinical trials. *Chinese Journal of Cancer*, Septembre 2014, 33(9):434-444.
17. CURRY WT, LIM M, Immunomodulation : checkpoint blockade etc. *Neuro-Oncology*, Novembre 2015, 17:vii26-vii31.
18. STANCULEANU DL, DANIELA Z, LAZESCU A, BUNGHEZ R, ANGHEL R, Development of new immunotherapy treatments in different cancer types. *Journal of Medicine and Life*, Juillet-Septembre 2016, 9(3):240-248.
19. AZIJLI K, STELLOO E, PETERS GJ, VAN DEN EERTWEGH AJM, New developments in the treatment of metastatic melanoma : immune checkpoint inhibitors and targeted therapies. *Anticancer Research*, Avril 2014, 34(4):1493-505.

20. BUCHBINDER EI, DESAI A, CTLA-4 and PD-1 pathways: Similarities, differences and implications of their inhibition. *American Journal of Clinical Oncology*, Février 2016, 39(1):98-106.
21. WELLS AD, WALSH MC, BLUESTONE JA, TURKA LA, Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy. *Journal of Clinical Investigation*, 15 Septembre 2001, 108(6):895-904.
22. EGEN JG, ALLISON JP, Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*, Janvier 2002, 16(1):23-35.
23. WOLCHOK JD, SAENGER Y, The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *The Oncologist*, 2008, 13(4):2-9.
24. LIU JQ, LI XY, YU HQ, YANG G, LIU ZQ, GENG XR, WANG S, MO LH, ZENG L, ZHAO M, FU YT, SUN HZ, LIU ZG, YANG PC, Tumor-specific Th2 responses inhibit growth of CT26 colon-cancer cells in mice via converting intratumor regulatory T cells to Th9 cells. *Scientific Reports*, 02 Juin 2015, 5:10665.
25. DUAN MC, ZHONG XN, LIU GN, WEI JR, The Treg/Th17 paradigm in lung cancer. *Journal of immunology Research*, 2014, 2014:730380.
26. GULDBRANDSEN KF, HENDEL HW, LANGER SW, FISCHER MB, Nuclear molecular imaging strategies in immune checkpoint inhibitor therapy. *Diagnostics*, 2017, 7(2):23.
27. HODI FS, O'DAY SJ, McDERMOTT DF, WEBER RW, SOSMAN JA, HAANEN JB, GONZALEZ R, ROBERT C, SCHADENDORF D, HASSEL JC, AKERLEY W, VAN DEN EERTWEGH AJM, LUTZKY J, LORIGAN P, VAUBEL JM, LINETTE GP, HOGG D, OTTENSMEIER CH, LEBBE C, PESCHEL C, QUIRT I, CLARK JI, WOLCHOK JD, WEBER JS, TIAN J, YELLIN MJ, NICHOL GM, HOOS A, URBA WJ, Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 19 Aout 2010, 363(8):711-723.

28. FAROLFI A, RIDOLFI L, GUIDOBONI M, NICOLETTI SV, PICIUCCHI S, VALMORRI L, COSTANTINI M, SCARPI E, AMADORI D, RIDOLFI R, Ipilimumab in advanced melanoma : reports of long-lasting responses. *Melanoma research*, Juin 2012, 22(3):263-70.
29. MEDLER TR, COTECHINI T, COUSSENS LM, Immune response to cancer therapy : Mounting an effective antitumor response and mechanisms of resistance. *Trends in Cancer*, Septembre 2015, 1(1):66-75.
30. GROSSO JF, JURE-KUNKEL MN, CTLA-4 blockade in tumor models : an overview of preclinical and translational research. *Cancer immunity*, 22 Juin 2013, 13:5.
31. TAKEDA K, KOJIMA Y, UNO T, HAYAKAWA Y, TENG MWL, YOSHIZAWA H, YAGITA H, GEJYO F, OKUMURA K, SMYTH MJ, Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules. *The Journal of Immunology*, 15 Mai 2010, 184(10):5493-501.
32. JURE-KUNKEL MN, MASTERS G, GIRIT E, DITO G, LEE F, HUNT JT, HUMPHREY R, Synergy between chemotherapeutic agents and CTLA-4 blockade in preclinical tumor models. *Cancer immunology, Immunotherapy*, 2013, 62:1533-1545.
33. LU L, XU X, ZHANG B, ZHANG R, JI H, WANG X, Combined PD-1 blockade and GITR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs. *Journal of Translational Medicine*, 2014, 12:36.
34. PULASKI BA, TERMAN DS, KHAN S, MULLER E, OSTRAND-ROSENBERG S, Cooperativity of *Staphylococcal aureus* enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Research*, 15 Mai 2000, 60:2710-2715.

35. COMMISSION EUROPEENNE, Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE, 22 Septembre 2010, transposée dans le droit français par le Décret n°2013-118, 1^{er} Février 2013.
36. NATIONAL RESEARCH COUNCIL Institute for Laboratory Animal Research, Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press, 1996.
37. GREEN EL, COLEMAN DL, KALISS N, DAGG CP, RUSSEL ES, FULLER JL, STAATS J, GREEN MC, Chapter 13: Anatomy. Dans *Biology of the laboratory mouse*, seconde édition, Dover Publications, New York, 1968.
38. TEICHER BA, p75, Chapter 3 : Transplantable Syngeneic Rodent Tumors : Solid Tumors in Mice. Dans *Tumor models in cancer research*, seconde edition, Humana Press, New York, 1er Décembre 2010.
39. LARKIN J, CHIARION-SILENI V, GONZALEZ R, GROB JJ, COWEY CL, LAO CD, SCHADENDORF D, DUMMER R, SMYLIE M, RUTKOWSKY P, FERRUCCI PF, HILL A, WAGSTAFF J, CARLINO MS, HAANEN JB, MAIO M, MARQUEZ-RODAS I, McARTHUR GA, ASCIERTO PA, LONG GV, CALLAHAN MK, POSTOW MA, GROSSMANN K, SZNOL M, DRENO B, BASTHOLT L, YANG A, ROLLIN LM, HORAK C, HODI FS, WOLCHOK JD, Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 2 Juillet 2015, 373(1):23-34.
40. WHITESIDE TL, The role of regulatory T cells in cancer immunology. *ImmunoTargets and Therapy*. 2015, 4:159-171.
41. DENG L, ZHANG H, LUAN Y, ZHANG J, XING Q, DONG S, WU X, LIU M, WANG S, Accumulation of FoxP3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clinical Cancer Research*, Aout 2010, 15;16(16):4105-12.
42. MALL C, SCKISEL GD, PROIA DA, MIRSOIAN A, GROSSENBACHER SK, PAI CS, CHEN M, MONJAZEB AM, KELLY K, BLAZAR BR, MURPHY WJ, Repeated PD-

- 1/PD-L1 monoclonal antibody administration induces fatal xenogeneic hypersensitivity reactions in a murine model of breast cancer. *Oncoimmunology*, Février 2016, 5(2):e1075114.
43. TISONCIK JR, KORTH MJ, SIMMONS CP, FARRAR J, MARTIN TR, KATZE MG, Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mars 2012, 76(1):16-32.
44. LESNIAK WG, CHATTERJEE S, GABRIELSON M, LISOK A, WHARRAM B, POMPER MG, NIMMAGADDA S, PD-L1 detection in tumors using [⁶⁴Cu]Atezolizumab with PET. *Bioconjugate Chemistry*, 21 Septembre 2016, 27(9):2103-2110.
45. BARTKOWIAK T, CURRAN MA, 4-1BB agonists: Multi-potent potentiators of tumor immunity. *Frontiers in Oncology*, 2015, 5:117.
46. LE HK, GRAHAM L, CHA E, MORALES JK, MANJILI MH, BEAR HD, Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/C mice. *International Immunopharmacology*, Juillet 2009, 9(7-8):900-9.
47. LIU M, JIN X, HE X, PAN L, ZHANG X, ZHAO Y, Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1-tumor bearing mice. *Plos One*, 2015, 10 (3):e0121921.
48. KU AW, MUHICHTH JB, POWERS CA, DIEHL M, KIM M, FISHER DT, SHARDA AP, CLEMENTS VK, O'LOUGHLIN K, MINDERMAN H, MESSMER MN, MA J, SKITZKI JJ, STEEBER DA, WALCHECK B, OSTRAND-ROSENBERG S, ABRAMS SI, EVANS SS, Tumor-induced MDSC act via remote control to inhibit L-selectin-dependent adaptive immunity in lymph nodes. *eLife*, 2016, 5:e17375.
49. ROZALI EN, HATO SV, ROBINSON BW, LAKE RA, LESTERHUIS WJ, Programmed death Ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 2012:656340.

50. VIVIER E, UGOLINI S, BLAISE D, CHABANNON C, BROSSAY L, Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 22 Mars 2012, 12(4):239-252.
51. ELLYARD JI, SIMSON L, PARISH CR, Th2-mediated anti-tumour immunity : friend of foe? *Tissue Antigens*, Juillet 2007, 70(1):1-11.
52. CHINAI JM, JANAKIRAM M, CHEN F, CHEN W, KAPLAN M, ZANG X, New immunotherapies targeting the PD-1 pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, Septembre 2015, 36(9):587-95.
53. PATEL SP, KURZROCK R, PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, Avril 2015, 14(4):847-56.
54. ZOU W, WOLCHOK JD, CHEN L, PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers and combinations. *Science Translational Medicine*, 2 Mars 2016, 8(328).
55. MENG X, HUANG Z, TENG F, XING L, YU J, Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, Décembre 2015, 41(10):868-76.
56. JOCHEMS C, SCHLOM J, Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 1er Mai 2011, 236(5):567-579.
57. GALON J, PAGES F, MARINCOLA FM, ANGELL HK, THURIN M, LUGLI A, ZLOBEC I, BERGER A, BIFULCO C, BOTTI G, TATANGELO F, BRITTEN CM, KREITER S, CHOUCANE L, DELRIO P, ARNDT H, ASSLABER M, MAIO M, MASUCCI GV, MIHM M, VIDAL-VANACLOCHA F, ALLISON JP, GNJATIC S, HAKANSSON L, HUBER C, SINGH-JASUJA H, OTTENSMEIER C, ZWIERZINA H, LAGHI L, GRIZZI F, OHASHI PS, SHAW PA, CLARKE BA, WOUTERS BG, KAWAKAMI Y, HAZAMA S, OKUNO K, WANG E, O'DONNELL-TORMEY J, LAGORCE C, PAWELEC G, NISHIMURA MI, HAWKINS R, LAPOINTE R,

LUNDQVIST A, KHLEIF SN, OGINO S, GIBBS P, WARING P, SATO N, TORIGOE T, ITOH K, PATEL PS, SHUKLA SN, PALMQVIST R, NAGTEGAAL ID, WANG Y, D'ARRIGO C, KOPTEZ S, SINICROPE SA, TRINCHIERI G, GAJEWSKI TF, ASCIERTO PA, FOX BA, Cancer classification using the immunoscore: a worldwide task force. *Journal of Translational Medicine*, 2012, 10:205.

58. CHESTER C, AMBULKAR S, KOHRT HE, 4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2016, 65(10):1243-1248.

59. TOPALIAN SL, DRAKE CG, PARDOLL DM, Immune checkpoint blockade : a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell*, 13 Avril 2015, 27(4):450-461.

Annexe 1 : Mode opératoire de culture cellulaire

- Conditions de culture

Les cellules tumorales sont cultivées en monocouche, à 37°C et sous atmosphère contrôlée, constituée à 95% d'air et à 5% de CO₂. Les flacons sont munis de bouchons à filtre afin de permettre les échanges gazeux. Le milieu de culture est composé de RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contenant de la L-glutamine à 2mM (réf : BE12-702F, Lonza, Verviers, Belgique) et supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) à hauteur de 10% (réf : 3302, PAN, Aidenbach, Allemagne). Concernant la lignée 4T1, le milieu de culture est également supplémenté avec 10mM d'HEPES (réf : BE17-737E, Lonza), 4,5g/L de glucose et 1mM de pyruvate de sodium (BE13-115E, Lonza), conformément aux préconisations du fournisseur. Les cellules sont adhérentes à la flasque. La quantité de cellules nécessaire à chaque expérience est obtenue par des passages successifs lorsque la confluence est atteinte (70 à 90% de confluence attendus).

- Passages

La fréquence des passages varie de 3 jours à 1 semaine selon la lignée. Le milieu de culture est tout d'abord vidé par retournement. Les cellules tumorales sont ensuite rincées (afin d'éliminer le maximum de milieu qui inhibe la trypsine) et décrochées des flasques de culture grâce à un traitement de 5 min environ à la trypsine-Versene[®] (réf : BE17-161E, Lonza) en milieu de Hanks exempt de calcium et magnésium (réf : BE10-543F, Lonza) et à 37°C. Les cellules sont observées continuellement et, lorsqu'elles commencent à s'arrondir, le flacon est tapoté délicatement afin d'accélérer leur détachement. Le traitement est alors neutralisé par ajout de milieu de culture en excès (au moins 10 fois le volume de trypsine) contenant 10% de SVF. La suspension est aspirée/refoulée plusieurs fois afin de mettre en suspension, récupérer et individualiser le maximum de cellules possible. Elles sont alors comptées à l'aide d'un hémocytomètre et la viabilité est évaluée par ajout de bleu trypan à 0,25% (réf : 17-942E, Cambrex, Emerainville, France). La quantité de cellules à réimplanter dans un nouveau milieu de culture est obtenue par simple dilution et varie aussi avec le nombre de jours de culture nécessaire pour atteindre la confluence attendue et la taille du flacon ensemencé.

- Assurance qualité
 - Test mycoplasme

Les mycoplasmes sont des procaryotes, dépourvus de paroi bactérienne, largement répandus dans la nature et qui engendrent des arrêts ou des changements dans la croissance cellulaire des lignées infectées. Le test mycoplasme permettant de détecter une contamination est effectué toutes les 2 semaines sur les cellules qui sont en culture et avant congélation de culots cellulaires. Quelques millilitres de surnageant de cultures sont récupérés et analysés via le test Mycoalert® (réf : LT07-118, Lonza) conformément à la notice du fournisseur. Ce test exploite l'activité d'enzymes spécifiques des mycoplasmes afin de les détecter.

- Dérive des lignées

Afin d'éviter les problèmes liés à la dérive naturelle des lignées cellulaires, les cultures sont stoppées lorsque le 20^{ème} passage est atteint à Oncodesign, sans tenir compte des passages antérieurs. De nouvelles cellules doivent donc être décongelées pour poursuivre les expériences.

- Contaminations interlignées / Contrôle des suspensions injectées *in vivo*

Un culot de 1 million de cellules est produit systématiquement juste avant l'inoculation aux animaux pour analyse génétique de la qualité de la suspension. Ceci permet de mettre en évidence d'éventuelles contaminations entre plusieurs lignées, et surtout de vérifier que la lignée employée est bien la lignée demandée pour exclure tout problème d'identification des flacons.

Annexe 2 : Protocole de coloration HE

Déparaffinage	Four 56°C	60 min
	Xylène	5 min
	Xylène	5 min
Réhydratation	Ethanol 100%	3 min
	Ethanol 80%	3 min
	Ethanol 70%	3 min
	Eau	3 min
Coloration	Hématoxyline de Mayer	5 min
	Eau	3 min
	Ethanol 100%	30 sec
	Eosine Y	2 min
	Ethanol 100%	2 min
	Ethanol 100%	2 min
Déshydratation	Ethanol 100%	2 min
	Isopropanol	2 min
	Isopropanol	2 min
Montage	Isomount 2000	-

Hématoxyline de Mayer : réf 10047105, VWR.

Eosine Y : réf 10047101, VWR.

Isomount 2000 : réf 05547535, VWR.

Montage sur lames Superfrost plus (réf : 10149870, Thermo Scientific)

Annexe 3 : Protocole de marquage pour analyse FACS

- Dissociation mécanique des échantillons via un tamis 70µm (réf : 322350, Dutscher, Brumath, France)
- Comptage des cellules et estimation de la viabilité par ajout de bleu trypan
- Mise en suspension d'1 million de cellules par échantillon dans un tube de comptage contenant du tampon FACS composé de :
 - DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, réf : 12-512F, Lonza)
 - Albumine sérique bovine à hauteur de 0,2% (réf : A3059, Sigma Aldrich, Lyon, France)
 - Azoture de sodium à hauteur de 0,02% (réf : S2002, Sigma Aldrich)
- Lyse des globules rouges par ajout de tampon de lyse 1X préalablement préparé (réf : 555899 (10X), BD Biosciences) puis incubation 15 min à température ambiante.
- Les suspensions sont lavées par ajout de 500µL de tampon, centrifugation à 300g pendant 10 min puis ajout de tampon FACS neuf.
- Marquage des cellules par ajout des anticorps anti-mCD45, anti-mCD3, anti-mCD8 et anti-mCD4 ou de leur isotype (cf. tableau ci-dessous), incubation dans le noir pendant 20 min à température ambiante.
- Marquage au FoxP3 suivant le protocole décrit en **Annexe 4**.
- Les suspensions sont enfin reprises dans 150µL de suspension de microbilles de référence PKH26 (réf : P7458, Sigma Aldrich) diluée au ½ en tampon FACS.
- Comptage au cytomètre LSR II (BD Biosciences).

Cible	Fluorochrome	Absorbance max (nm)	Emission max (nm)	Espèce ciblée	Espèce de production	Référence	Fournisseur
FoxP3	PE	496	578	Humain/souris	Souris	130-093-014	Miltenyi Biotec
Isotype FoxP3	PE	496	578	-	Souris	A07796	Beckman Coulter
CD8a	PerCP	482	678	Souris	Rat	553036	BD Biosciences
Isotype CD8a	PerCP	482	678	-	Rat	553933	BD Biosciences
CD3	V450	404	448	Souris	Rat	561389	BD Biosciences
Isotype CD3	V450	404	448	-	Rat	560457	BD Biosciences
CD4	VioGreen	405	520	Souris	Rat	130-102-444	Miltenyi Biotec
Isotype CD4	VioGreen	405	520	-	Rat	130-102-659	Miltenyi Biotec
CD45	APC-Cy7	650	785	Souris	Rat	557659	BD Biosciences
Isotype CD45	APC-Cy7	650	785	-	Rat	552773	BD Biosciences

Annexe 4 : Protocole de marquage FoxP3 pour analyse FACS

750 µl Fixation/Permabilisation Solution2
1X Permabilisation Buffer
Dilute 10X Permeabilisation Buffer at 1:10 with deionized or distilled water. For 1 sample, Vf = 2,3 ml :
230 µl Fixation/Permeabilisation Solution + 2,070 ml Fixation/Permabilisation Solution2
Cell surface staining
<ul style="list-style-type: none"> * washing : 300g, 10 min centrifugation * cell pellet + 90 µL of buffer PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA C° = 1.10⁶ cells / 110 - (10 * nb antibody) µL buffer * + 10µL CD25-APC * + 10µL CD4-FITC * 10 min, 4°C * washing : + 1-2 mL of buffer / 1.10⁶ cells 300g, 5 min, 4°C centrifugation
Cell fixation / permeabilisation
<ul style="list-style-type: none"> * cell pellet resuspension : C° = 1.10⁶ cells / 1 mL of cold Fixation / Permeabilisation Solution * 30 min, 4°C * washing : + 1-2 ml of cold buffer / 1.10⁶ cells 300g, 5 min, 4°C centrifugation * washing : + 1-2 mL of cold 1X Permeabilization Buffer / 1.10⁶ cells 300g, 5 min, 4°C centrifugation * resuspension : C° ≤ 1.10⁶ cells / 80 µl of cold 1X Permeabilization Buffer * + 20 µL FcR blocking reagent * 5 min, 4°C
Foxp3 staining

Cible	Fluorochrome	Absorbance max (nm)	Emission max (nm)	Espèce ciblée	Espèce de production	Référence	Fournisseur
FoxP3	PE	496	578	Humain/souris	Souris	130-093-014	Miltenyi Biotec
Isotype FoxP3	PE	496	578	-	Souris	A07796	Beckman Coulter

Set de tampons pour marquage FoxP3 : réf 130-093-142 (Miltenyi Biotec).

FcR blocking reagent : réf 130-092-575 (Miltenyi Biotec).

Annexe 5 : Protocole de dosage de cytokines circulantes par Luminex®

Issu de la notice du kit MCYTOMAG-70K-PMX (Merk Millipore)

IMMUNOASSAY PROCEDURE

1. Add 200 µL of Wash Buffer into each well of the plate. Seal and mix on a plate shaker for 10 minutes at room temperature (20-25°C).
2. Decant Wash Buffer and remove the residual amount from all wells by inverting the plate and tapping it smartly onto absorbent towels several times.

3. Add 25 μ L of each Standard or Control into the appropriate wells. Assay Buffer should be used for 0 pg/mL standard (Background).
4. Add 25 μ L of Assay Buffer to the sample wells.
5. Add 25 μ L of appropriate matrix solution to the background, standards, and control wells. When assaying serum or plasma, use the Serum Matrix provided in the kit. When assaying tissue culture or other supernatant, use proper control culture medium as the matrix solution.
6. Add 25 μ L of Sample (diluted one part serum or plasma to one part Assay Buffer) into the appropriate wells.
7. Vortex Mixing Bottle and add 25 μ L of the Mixed or Premixed Beads to each well. (Note: During addition of Beads, shake bead bottle intermittently to avoid settling.)
8. Seal the plate with a plate sealer. Wrap the plate with foil and incubate with agitation on a plate shaker overnight at 2-8°C. *Alternatively, incubate with agitation for 2 hours at room temperature (20-25°C). However, overnight incubation (16-18 hr) is required for optimal assay sensitivity, precision, and accuracy.*
9. Gently remove well contents and wash plate 2 times following instructions listed in the **PLATE WASHING** section.
10. Add 25 μ L of Detection Antibodies into each well. (Note: Allow the Detection Antibodies to warm to room temperature prior to addition.)
11. Seal, cover with foil and incubate with agitation on a plate shaker for 1 hour at room temperature (20-25°C). **DO NOT ASPIRATE AFTER INCUBATION.**
12. Add 25 μ L Streptavidin-Phycoerythrin to each well containing the 25 μ L of Detection Antibodies.
13. Seal, cover with foil and incubate with agitation on a plate shaker for 30 minutes at room temperature (20-25°C).
14. Gently remove well contents and wash plate 2 times following instructions listed in the **PLATE WASHING** section.
15. Add 150 μ L of Sheath Fluid (or Drive Fluid if using MAGPIX®) to all wells. Resuspend the beads on a plate shaker for 5 minutes.
16. Run plate on Luminex® 200™, HTS, FLEXMAP 3D™ or MAGPIX® with xPONENT software.
17. Save and analyze the Median Fluorescent Intensity (MFI) data using a 5-parameter logistic or spline curve-fitting method for calculating cytokine/chemokines concentrations in samples. (Note: For diluted samples, multiply the calculated concentration by the dilution factor.)

**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

**CARACTERISATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE DANS 3 MODELES
IN VIVO DE CANCERS TRAITES PAR DES INHIBITEURS DE CHECKPOINTS
IMMUNITAIRES**

RAMELET Maxime

Les succès cliniques rencontrés par les thérapies visant CTLA-4 et PD1 ont ouvert une nouvelle voie thérapeutique ciblant les checkpoints immunitaires et constituent une avancée scientifique majeure dans le traitement des cancers. Afin d'étudier *in vivo* ces nouvelles thérapies pour poursuivre leur développement, il est nécessaire de déterminer des paramètres permettant de caractériser la réponse immunitaire induite suite à l'administration d'inhibiteurs de ces checkpoints immunitaires (ICI). Dans ce projet, les analyses se sont portées sur trois modèles de tumeur, à savoir 4T1, EMT-6 et CT26 et les checkpoints immunitaires ciblés sont PD1, PD-L1, 4-1BB et CTLA-4. Les paramètres évalués sont principalement l'infiltration lymphocytaire intratumorale et intranodale et le profil d'expression de 25 cytokines et chimiokines circulantes. L'efficacité des traitements administrés est réelle et semble être corrélée à un ratio T CD8+ effecteurs / T CD4+ FoxP3+ régulateurs élevé au sein des tumeurs. Toutefois, comme en clinique, cette efficacité est individu et tumeur-dépendante. En effet, les animaux d'un même groupe et les trois modèles entre eux ne réagissent pas de la même manière, notamment 4T1 qui est particulièrement résistant. De plus, les animaux porteurs spécifiquement de cette tumeur présentent un risque élevé de mortalité suite à des injections répétées d'anticorps ciblant PD-L1, PD1 ou CTLA-4. Cette létalité semble être corrélée à un relargage massif de cytokines induisant une réaction de type anaphylaxie qui aboutit à la mort de l'animal. Afin de dépasser cette résistance et de diminuer la mortalité, plusieurs combinaisons d'ICI ont été testées dans ce modèle. Il en ressort principalement que les combinaisons associant un ICI avec un anticorps anti-4-1BB induisent très peu de mortalité comparées aux monothérapies. Ce bénéfice est associé à une augmentation de l'infiltration lymphocytaire pulmonaire et à une modulation du profil d'expression cytokinique des monothérapies. Les comparaisons entre EMT-6 et 4T1, deux modèles relativement proches du point de vue histologique, permettent de mettre en évidence des profils d'expression cytokinique différents impliquant une réponse dépendante de la tumeur. Dans les deux cas, l'anticorps anti-4-1BB module la réponse immunitaire pour la rendre plus efficace. La poursuite de la caractérisation de ces réponses est longue et difficile en raison de la complexité du système immunitaire et nécessite une capacité d'analyse importante. Ce projet apporte sa pierre à l'édifice dans la compréhension des mécanismes mis en jeu et notamment dans l'intérêt porté sur 4-1BB. La poursuite des investigations pourrait permettre à terme, dans le cadre d'un essai clinique, de maintenir les patients sous immunothérapie grâce à l'administration d'un anticorps anti-4-1BB dès l'apparition d'effets secondaires importants.

MOTS-CLES : Checkpoint immunitaire ; cancer ; cytokines ; choc anaphylactique, lymphocyte