



UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2015

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Immunothérapie à base de cellules dendritiques autologues couplée à
une association imiquimod / cyclophosphamide chez des malades
atteints d'un mélanome métastatique.**

Présentée et soutenue publiquement le 23 juin 2015 à 18 heures
au Pôle Recherche

Par Pauline LEPESANT

JURY

Président :

Monsieur le Professeur P. MARCHETTI

Assesseurs :

Monsieur le Professeur M. HEBBAR

Madame le Docteur AS. HATZFELD

Madame le Docteur E. MARTIN DE LASSALLE

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur L. MORTIER

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

AMM	autorisation de mise sur le marché
ARN	acide ribonucléique
CD	cellules dendritiques
CD-I3	cellules dendritiques générées avec une combinaison d'IL-3 et d'IFN- β
CD-G4	cellules dendritiques générées avec une combinaison de GM-CSF et d'IL-4
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CRP	protéine C réactive
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HES	hématéine-éosine-safran
IFN	interféron
IL	interleukine
LDH	lactate déshydrogénase
LT	lymphocytes T
MDSC	myeloid derived suppressor cells
NK	lymphocytes natural killer
TEP-18FDG	tomoscintigraphie par émission de positons au 18Fluoro-deoxy-glucose
TCR	récepteur des cellules T
TLR	toll like receptor
TNF	tumor necrosis factor

Table des matières

Résumé	1
Introduction	2
I. Le mélanome	2
II. Immunothérapies dans le mélanome.....	3
A. Généralités.....	3
B. Différentes immunothérapies utilisées	4
1. L'immunothérapie active non spécifique d'antigènes : les cytokines	4
2. L'immunothérapie adoptive	4
3. L'immunothérapie active spécifique d'antigènes : les vaccinations	7
III. Cellules dendritiques	8
IV. Vaccination par cellules dendritiques	10
A. Principes de la vaccination par cellules dendritiques.....	10
B. Génération de cellules dendritiques.....	12
1. Différents types de cellules dendritiques utilisées pour la vaccination... ..	12
2. Maturation des cellules dendritiques	13
3. Chargement antigénique des cellules dendritiques.....	14
4. Voie d'administration des cellules dendritiques.....	15
5. Migration des cellules dendritiques	15
C. Résultats de la vaccination par cellules dendritiques	16
D. Limites actuelles et stratégies d'optimisation de la vaccination par cellules dendritiques.....	17
V. Rationnel de l'essai clinique associant la vaccination par cellules dendritiques à des traitements par imiquimod topique et cyclophosphamide.....	18
A. Chargement des cellules dendritiques in vivo.....	18
B. Imiquimod.....	19
C. Cyclophosphamide	19
D. Étude préclinique	20
E. Objectifs de l'étude.....	22
Matériels et méthodes	23
I. Objectifs de l'étude	23
II. Méthodologie de l'essai	24
III. Patients.....	24
A. Critères d'inclusion.....	24
B. Critères de non inclusion.....	25
IV. Description des traitements administrés	26

A. Cyclophosphamide.....	26
B. Imiquimod.....	26
C. Cellules dendritiques.....	26
V. Contrôle de la qualité des produits.....	29
VI. Déroulement de l'étude.....	30
VII. Evaluation du protocole.....	33
A. Critère de jugement principal.....	33
B. Critères de jugement secondaires.....	34
1. L'effet du protocole sur la population des lymphocytes T régulateurs au niveau sanguin.....	34
2. La toxicité du protocole.....	34
3. La survie globale des patients.....	35
4. L'effet du protocole sur l'infiltrat lymphocytaire au sein de métastases cutanées en histologie.....	36
5. La corrélation entre la réponse clinique et différents paramètres biologiques.....	36
6.....	36
VIII. Considérations éthiques.....	37
Résultats.....	38
I. Description des cas.....	38
II. Réponse clinique.....	40
III. toxicité.....	51
IV. Survie.....	51
V. Analyse des LT régulateurs.....	53
VI. Analyse histologique.....	55
VII. Analyse des paramètres biologiques.....	62
Discussion.....	64
I. Apports et limites de notre travail.....	64
II. Vaccination par cellules dendritiques dans d'autres tumeurs.....	68
III. Place de la vaccination par cellules dendritiques en association dans le mélanome.....	69
A. Association aux anti-RAF et anti-MEK.....	69
B. Association aux anti-CTLA-4.....	70
C. Association aux chimiothérapies.....	71
D. Association à la radiothérapie.....	71
Conclusion.....	73
Références bibliographiques.....	74
Annexes.....	87
Annexe 1 : Feuille d'observation du patient.....	87
Annexe 2 : Lettre d'information et consentement éclairé du patient.....	88

RESUME

Contexte : La prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique a considérablement évolué ces dernières années avec le développement de thérapies ciblées et d'immunothérapies. L'immunothérapie à base de cellules dendritiques a pour objectif de capitaliser la capacité des cellules dendritiques à diriger les lymphocytes T et NK à devenir des effecteurs antitumoraux capables d'éradiquer les cellules malignes.

Méthode : Nous avons réalisé une étude prospective ouverte de phase II, monocentrique, dans le service de Dermatologie du CHRU de Lille, chez des patients atteints de mélanome métastatique entre mai 2010 et août 2013. Notre travail visait à évaluer l'efficacité d'une immunisation avec des cellules dendritiques autologues de type CD-13 par injection intra-tumorale au sein de métastases cutanées préalablement traitées par de l'imiquimod topique en association à un traitement par cyclophosphamide chez des patients atteints de mélanome métastatique.

Résultats : Cinq patients étaient inclus dans cette étude. Il était observé une réponse partielle, une stabilité de la maladie, une maladie lentement évolutive et deux progressions. La survie moyenne globale était de 29 mois et la survie moyenne sans progression de 7,2 mois. Aucun événement indésirable modéré ou sévère n'était survenu. La diminution des lymphocytes T régulateurs dans le sang périphérique n'était pas corrélée à une meilleure réponse clinique. Le cyclophosphamide ne permettait pas une diminution efficace des lymphocytes T régulateurs. Pour les patients ayant présenté une réponse partielle et une maladie lentement évolutive, une majoration de l'infiltrat lymphocytaire au sein des métastases cutanées était mise en évidence.

Conclusion : Malgré les résultats encourageants de ce protocole de vaccination à base de cellules dendritiques, cette technique nécessite d'être améliorée avant de pouvoir être proposée dans l'arsenal thérapeutique du mélanome métastatique.

INTRODUCTION

I. Le mélanome

Le mélanome représente un problème de santé publique majeur en raison de son incidence qui double environ tous les dix ans. Le taux d'incidence (standardisé monde) en 2012 était estimé à 10,8 nouveau cas pour 100000 hommes et 11 nouveaux cas pour 100000 femmes. Avec environ 11 176 nouveaux cas estimés en France en 2012 dont 48% survenant chez l'homme, le mélanome représente 3,1% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers estimés en 2012.

Cette tumeur facilement curable lorsqu'elle est prise en charge à un stade précoce de la maladie, devient particulièrement redoutable au stade métastatique. A ce dernier stade, la survie à 5 ans en 2010 était estimée à moins de 20 % et la médiane de survie entre 6 et 9 mois.

La maladie métastatique nécessite un traitement systémique. La chimiothérapie par dacarbazine était il y a quelques années le traitement de référence avec des taux de réponse d'environ 15 à 20 % mais sans amélioration de la médiane de survie (1).

Récemment le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, avec notamment les thérapies ciblées et les immunothérapies, a considérablement amélioré le pronostic des patients présentant un mélanome métastatique. Les anti-RAF, présentés en 2010, sont actuellement proposés aux patients métastatiques mutés B-RAF permettant ainsi une augmentation de la survie globale à 13,6 mois (HR=0,37) (2). Cependant il existe des limites à ces traitements avec l'acquisition fréquente de résistances conduisant à l'échappement au traitement et de nombreux effets indésirables. L'association d'anti-RAF et d'anti-MEK pourrait encore améliorer le pronostic de ces patients en allongeant leur survie globale (3)(4). La prise en charge du mélanome métastatique est donc en plein changement avec le développement de nouvelles stratégies innovantes : les anti-RAF (2), les associations d'anti-RAF et d'anti-MEK (3–6), les anti-CTLA-4 (7,8), les anti-PD-1/PD-L1 (9–12)(13).

II. Immunothérapies dans le mélanome

A. Généralités

Une relation étroite entre système immunitaire et mélanome est décrite. En effet, on constate :

- une augmentation de l'incidence du mélanome en cas d'immunodépression.

- le développement de vitiligo chez des patients atteints de mélanome reflétant le développement d'une réponse immunitaire ciblant les antigènes associés au mélanome également présents sur les mélanocytes normaux (14). Le développement de vitiligo chez des patients atteints de mélanome métastatique traités par immunothérapie est décrit comme un facteur de bon pronostic associé à une augmentation de la survie de 8.5 mois à 18.2 mois (15).

- des régressions spontanées de la maladie caractérisées par une forte infiltration de lymphocytes T (LT), en majorité cytotoxiques, et de cellules dendritiques (CD) matures. Même en l'absence de régression spontanée, cette infiltration de la tumeur par les LT est un facteur de bon pronostic (16)(17)(18) puisque les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont actuellement considérés comme les médiateurs fondamentaux de la réponse immune anti-tumorale (19).

De plus la première découverte d'antigènes tumoraux reconnus par les LT d'un patient était réalisée à partir de cellules de mélanome humain (20). Les gènes codant pour les antigènes MAGE 1, 2 et 3 étaient ainsi identifiés en 1991 (21,22) puis les gènes codant pour la tyrosinase en 1993 (23), MART 1 (24) et la glycoprotéine 100 en 1994 (25).

Ces données ont encouragé de nombreuses équipes à développer des stratégies d'immunothérapie anti-tumorale.

B. Différentes immunothérapies utilisées

1. L'immunothérapie active non spécifique d'antigènes : les cytokines

Les premières immunothérapies utilisées dans le mélanome étaient des cytokines avec l'interleukine (IL)-2 et l'interféron alpha (IFN- α). L'IL-2, proposée en situation métastatique à fortes doses, peut permettre une rémission complète et durable mais seulement chez un faible pourcentage de patients (26)(27). L'INF- α est proposé en situation adjuvante afin de retarder l'apparition de métastases mais ne permet pas d'augmenter la survie globale (28–30). L'utilisation des cytokines est limitée par la fréquence et la gravité des effets indésirables engendrés (30)(31).

2. L'immunothérapie adoptive

Les anticorps monoclonaux

Le développement des anticorps anti-CTLA-4 a permis une réelle avancée dans la prise en charge du mélanome métastatique puisqu'il s'agit de la première molécule apportant un bénéfice en terme de survie globale. L'ipilimumab (Yervoy®) a ainsi obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats unis en mars 2011 et en Europe en août 2011 en première et deuxième ligne (7). Le CTLA4, molécule exprimée à la surface des lymphocytes T activés, interagit avec la molécule B7 située à la surface des cellules présentatrices de l'antigène afin d'aboutir à un signal d'inactivation vis-à-vis du lymphocyte T. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal qui, en bloquant le CTLA4, lève le frein inhibiteur physiologique de la réponse immune et restaure ainsi l'activation des lymphocytes (Figure 1). Les effets indésirables de l'ipilimumab ne sont pas négligeables (Tableau I). Il s'agit d'effets indésirables potentiellement sévères (grade 3-4), essentiellement d'ordre immunologique avec notamment des prurits, des rashes, des colites, des hypophysites, des hépatites (7,8,32)(12).

Plus récemment, les anticorps anti-PD-1/PD-L1 ont confirmé l'intérêt de l'immunothérapie dans le mélanome métastatique, avec des résultats supérieurs à

ceux de l'ipilimumab et une toxicité moindre (16,33)(34) (Tableau I). PD-1 est un récepteur exprimé sur certains lymphocytes, son ligand principal PD-L1, est exprimé à la surface des cellules tumorales et de quelques cellules immunitaires. La liaison de PD-L1 avec PD-1 entraîne l'inactivation des lymphocytes T, essentiellement au sein des tissus périphériques, comme par exemple, au sein des métastases. Les inhibiteurs de PD-1 et de PD-L1 ont pour objectif de réactiver les lymphocytes «endormis» afin de tenter de restaurer une réponse immune anti-tumorale (Figure 1). Le pembrolizumab et le nivolumab sont les anti-PD-1 actuellement en cours de développement (16)(9)(10,11)(12)(13). Le pembrolizumab est actuellement enregistré aux Etats Unis sous le nom de Keytruda® et est actuellement en Autorisation Temporaire d'Utilisation en France depuis juillet 2014.

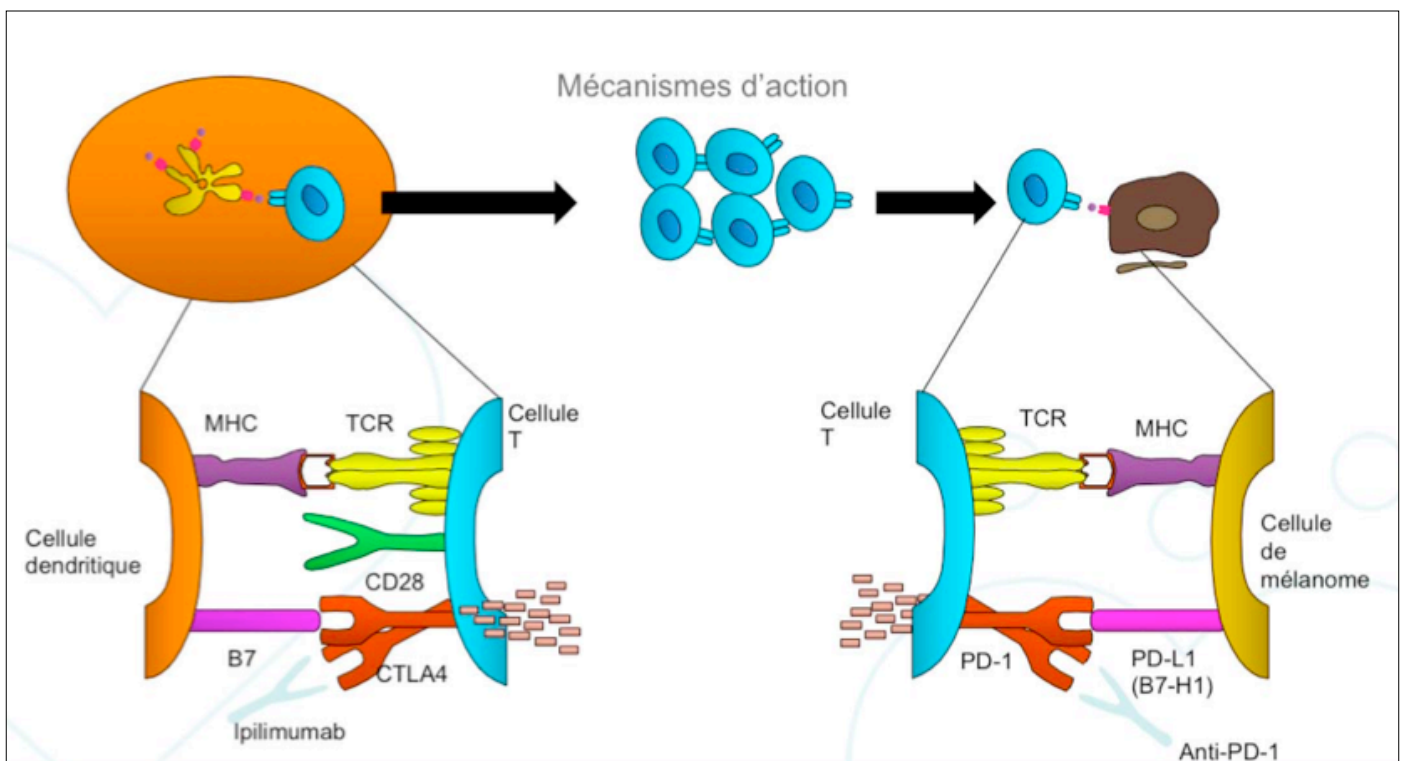


Figure 1 : Mécanisme d'action des anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD-1 (35)

	Anti-CTLA-4 (N = 256)		Anti-PD-1 (N = 277)	
	Tous grade (%)	Grade 3-4 (%)	Tous grade (%)	Grade 3-4 (%)
Effets indésirables liés au traitement	73	29,9	72,9	10,1
Asthénie	15,2	1,2	19,1	0,4
Diarrhées	22,7	3,1	14,4	1,1
Nausées	8,6	0,4	11,2	0,4
Hépatite	1,2	0,4	1,8	1,8
Colite	8,2	7	3,6	2,5
Prurit	25,4	0,4	14,1	0
Rash	14,5	0,8	13,4	0
Vitiligo	1,6	0	11,2	0
Arthralgie	5,1	0,8	11,6	0
Hypothyroïdie	2	0	8,7	0
Hyperthyroïdie	2,3	0,4	3,2	0
Hypophysite	2,3	1,6	0,7	0,4
Uvéite	0	0	1,1	0

Tableau I : Effets indésirables des anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD-1 (12)

Les cellules autologues activées

Cette technique consiste à isoler des cellules effectrices du système immunitaire d'un patient, de les manipuler en dehors de l'organisme et de les réinjecter au patient. L'objectif est d'amplifier la réponse immune antitumorale initiée in vivo. Des résultats encourageants sont obtenus en isolant des lymphocytes autologues et en les activant avec de l'IL-2 ou en isolant des lymphocytes issus des tumeurs (36–38)(39). Cependant la technique est lourde et non applicable en pratique courante.

3. L'immunothérapie active spécifique d'antigènes : les vaccinations

La vaccination de patients atteints de cancer repose sur le principe de reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques d'antigènes tumoraux spécifiques présents à la surface des cellules tumorales. Ces antigènes tumoraux sont présentés aux récepteurs des lymphocytes T par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'objectif est d'induire in vivo une réponse antitumorale efficace spécifique capable d'éradiquer les cellules malignes.

Pour la vaccination, les antigènes peuvent être administrés sous plusieurs formes : la vaccination peptidique, la vaccination par cellules tumorales, la vaccination par protéines de choc thermique et la vaccination par cellules présentatrices d'antigènes de type CD (17).

La vaccination peptidique consiste à injecter directement des peptides antigéniques synthétisés, des protéines recombinantes ou un lysat tumoral. Ces injections sont parfois associées à des traitements adjuvants pour augmenter l'immunogénicité (17). La vaccination par cellules tumorales consiste à injecter des cellules tumorales autologues ou allogéniques inactivées en association à un adjuvant (17). L'utilisation de protéines de choc thermique pour la vaccination est justifiée par la capacité de ces protéines à porter des peptides antigéniques puis à être endocytées par les cellules dendritiques. Les peptides sont alors présentés par les cellules dendritiques via les molécules du CMH (17). La vaccination par cellules présentatrices d'antigènes de type CD consiste à injecter ces cellules préalablement chargées avec les antigènes tumoraux (17).

Toutes ces stratégies vaccinales ont actuellement démontré leur efficacité dans des essais thérapeutiques mais nécessitent d'être améliorées afin d'obtenir des résultats satisfaisants (17).

III. Cellules dendritiques

Les CD sont des cellules présentatrices d'antigènes efficaces à la frontière entre le système immunitaire inné et adaptatif. Elles sont considérées comme les agents les plus puissants pour stimuler les LT (40)(41). Elles jouent un rôle dans la réponse immunitaire anti-microbienne mais également anti-tumorale (42,43).

Suivant leur état de maturation, les CD sont capables d'induire une tolérance c'est-à-dire d'empêcher les phénomènes d'auto-immunisation (lorsqu'elles sont immatures) ou d'induire une réponse immune contre les agents pathogènes (lorsqu'elles sont matures) (17)(44).

Dans les tissus périphériques, les CD sont dans un état immature caractérisé par leur forte capacité à capturer les antigènes. Après la capture d'un antigène, les CD subissent de fortes modifications phénotypiques, se mettent à sécréter des cytokines et des chimiokines, à exprimer différents récepteurs aux chimiokines leur permettant de migrer jusqu'au ganglion lymphatique drainant où elles finissent leur maturation. Parallèlement elles perdent leur capacité à capturer des antigènes, acquièrent un phénotype leur permettant d'activer des LT avec l'augmentation des molécules de costimulation (CD80, CD86 ...), des molécules du CMH de classe I et II. Elles produisent alors de l'IL-12 et deviennent ainsi des cellules initiateuses efficaces de la réponse T primaire et secondaire (45). Les CD présentent l'antigène aux lymphocytes via le CMH. Les molécules du CMH de classe I interagissent avec les lymphocytes T CD8 alors que celles du CMH de classe II interagissent avec les lymphocytes T CD4. Les lymphocytes T CD8 activés se différencient en lymphocytes cytotoxiques et les lymphocytes T CD4 se différencient en lymphocytes T helper 1 et 2 (40).

Il existe deux types différents de CD : les CD myéloïdes et les CD plasmacytoïdes. Ces deux populations de CD sont différentes d'un point de vue morphologique, moléculaire et fonctionnel (46) (Figure 2). Les CD myéloïdes se divisent en deux sous groupes : les cellules de Langerhans, CD situées dans

l'épiderme, et les CD interstitielles situées dans les tissus profonds, et notamment dans le derme. Lorsqu'elles sont matures, les CD myéloïdes induisent une réponse immune contre les agents pathogènes bactériens ou fongiques, en activant les LT CD4 et CD8 via une production d'IL-12 (17,44). Les CD plasmacytoïdes, exprimant à leur surface les toll like receptor (TLR) 7 et 9, sont capables de produire rapidement de grandes quantités d'IFN- α après un contact viral. Ces cellules ont une action cytotoxique propre, induisent une réponse des LT et des lymphocytes natural killer (NK) (17,47)(48).

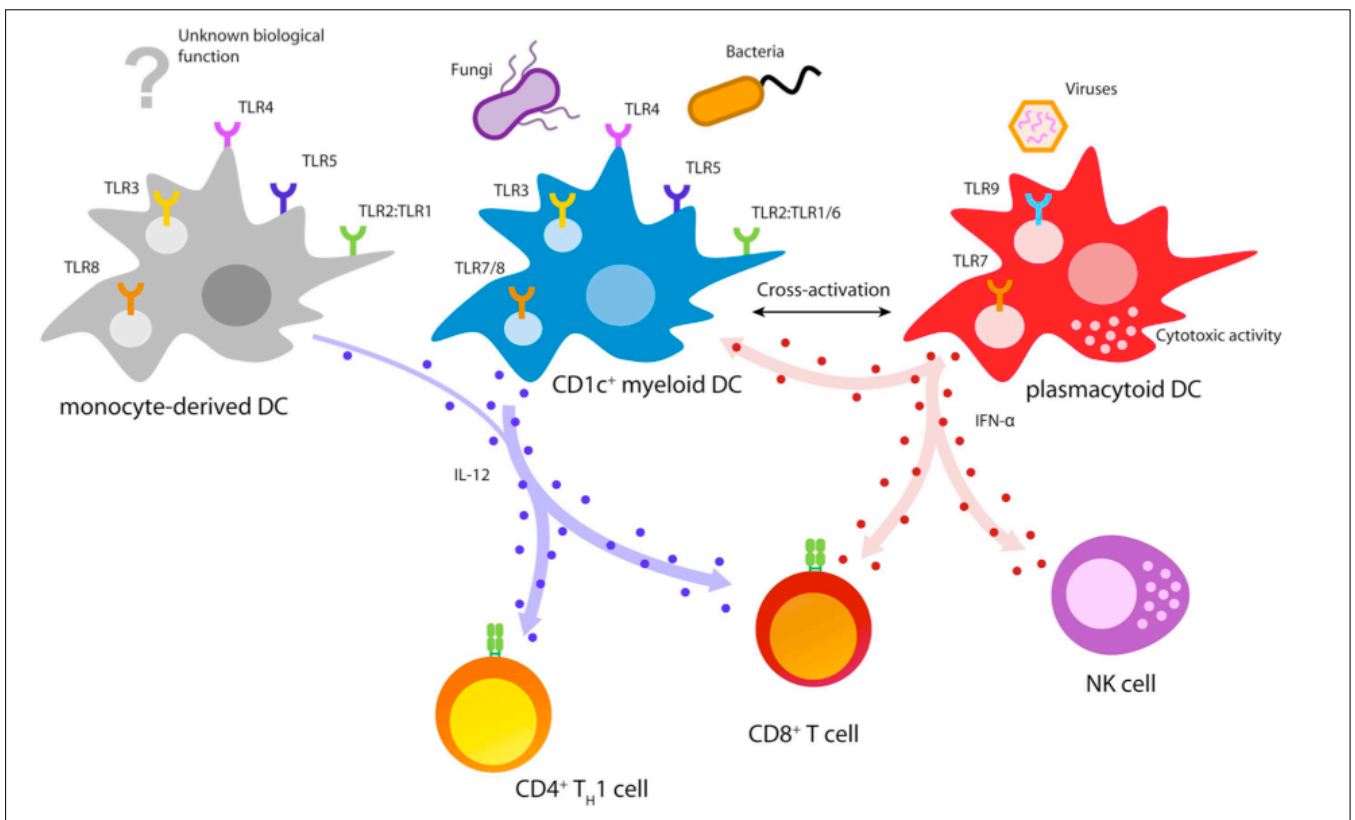


Figure 2 : Physiologie des CD (19)

IV. Vaccination par cellules dendritiques

A. Principes de la vaccination par cellules dendritiques

L'immunothérapie à base de CD a pour objectif de capitaliser la capacité des CD à diriger les LT et NK à devenir des effecteurs antitumoraux capables d'éradiquer les cellules malignes (49).

Le premier essai de vaccination de cellules dendritiques autologues a été réalisé en 1996 par F. Hsu *et al.* chez des patients présentant un lymphome B (50). Le premier essai concernant des patients présentant un mélanome métastatique a été réalisé en 1998 par Nestle *et al.* Les résultats de cette étude étaient encourageants avec l'observation d'une réponse pour 5 des 16 patients vaccinés sans aucune toxicité (51).

Les CD sont présentes dans le sang périphérique mais représentent moins d'1% des cellules mononuclées. Dans la majorité des essais, les CD sont générées *ex vivo* à partir de précurseurs hématopoïétiques CD34+ ou de monocytes autologues ou allogéniques. Elles subissent ensuite une maturation grâce à un cocktail de cytokines (40) et sont chargées avec des antigènes tumoraux puis injectées au patient lors de la vaccination (Figure 3).

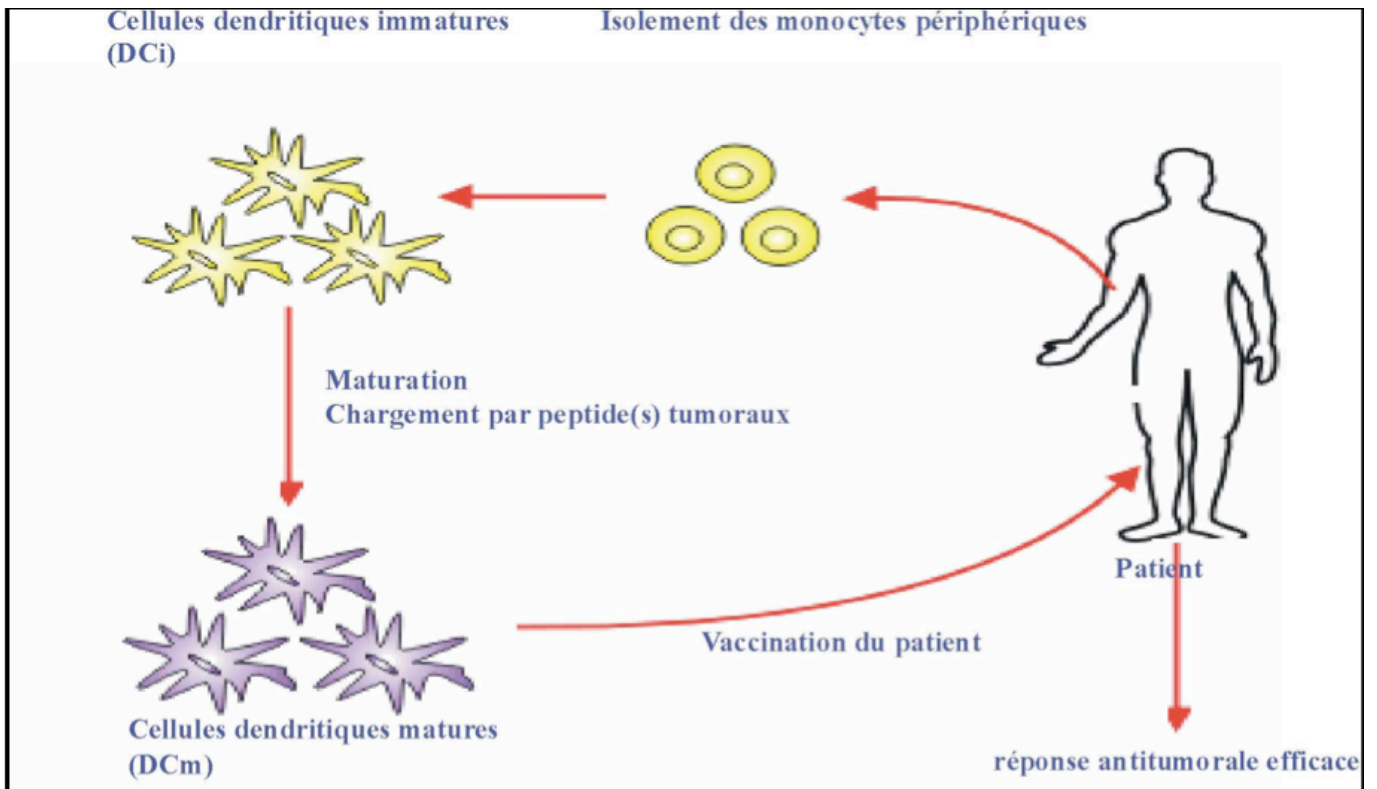


Figure 3 : Principe de la vaccination à base de CD

B. Génération de cellules dendritiques

1. Différents types de cellules dendritiques utilisées pour la vaccination

Plusieurs types de CD peuvent être générées in vitro avec des fonctionnalités différentes. L'environnement avec notamment les cytokines présentes dans le milieu de culture est un des paramètres important dans la genèse des CD. En effet le choix des cytokines influence le type de CD générées, leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles.

Les CD les plus utilisées dans les protocoles de vaccination sont les CD-G4 (52,53). Il s'agit de CD de type myéloïde générées à partir de monocytes du sang de donneur sain ou atteint d'un cancer en présence de granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) et d'IL-4 (54,55).

M. Goldman et ses collaborateurs ont proposé la culture de monocytes avec une combinaison d'IL-3 et d'IFN- β pour générer un nouveau type de CD présentant des caractéristiques plasmacytoïdes, les CD-I3 (56). L'IFN- β induit la différenciation des monocytes en CD (57) et l'IL-3 permet la survie des CD. Les CD-I3 maturées sont capables d'activer des LT CD8+ spécifiques d'un antigène tumoral in vitro (58,59). Certaines études mettent en évidence que les CD-I3 sont plus efficaces que les CD-G4 en termes de production d'IFN- α , d'IFN- γ et d'IL-5, récemment décrits comme jouant un rôle important dans la lutte anti-tumorale (58)(56,60). De plus une étude suggère que les CD-I3 ont la capacité de réguler les LT régulateurs via une production augmentée d'IL-6 (60).

Récemment plusieurs équipes se sont intéressées aux CD plasmacytoïdes dans l'idée de développer des CD plus performantes. En effet ces cellules ont la capacité de produire de grandes quantités d'IFN- α , de stimuler les LT et les NK. Il a donc été proposé de produire des CD plasmacytoïdes in vitro à partir de progéniteurs CD 34+ mis en culture avec différents cocktails de cytokines comme l'association Flt3-ligand, thrombopoïétine et IL-3 (61). Les CD plasmacytoïdes peuvent également être isolées à partir du produit de cytophérèse des patients. La vaccination est alors réalisée avec des CD naturelles (62).

Les cellules de Langerhans pourraient également être de bonnes candidates pour la vaccination compte tenu de leur capacité remarquable à stimuler les LT. Elles peuvent être obtenues à partir de précurseurs CD34+ mis en culture avec un cocktail de cytokines comprenant GM-CSF, tumor necrosis factor (TNF)- α , c-kit ligand, Flt3 ligand, transforming growth factor beta 1 (63,64). Elles peuvent également être générées à partir des précurseurs CD14 + mis en culture avec du GM-CSF et de l'IL-15 (65,66). Ces cellules ont la particularité de sécréter de l'IL-15. Elles ont une capacité à stimuler les LT bien meilleure que les CD-G4. Elles ont également la capacité de stimuler les NK et peuvent avoir une action cytotoxique propre (65). Un essai est actuellement en cours pour évaluer les cellules de Langerhans (67).

2. Maturation des cellules dendritiques

Plusieurs études rapportent une meilleure efficacité de la vaccination par CD si les CD injectées sont matures plutôt qu'immatures (68,69). De plus les CD immatures sont potentiellement dangereuses car elles sont impliquées dans des processus de tolérance.

La maturation des CD peut être déclenchée par :

- des éléments associés aux pathogènes tels que le lipopolysaccharide, l'acide lipotéichoïque, l'ADN bactérien (motif CpG), ou l'ARN double brin,
- des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-1, l'IL6, GM-CSF et l'IFN- α),
- le CD40 ligand (19,67,70).
- certaines protéines du choc thermique (17).

Dans la fabrication des CD-G4, le cocktail utilisé habituellement pour la maturation, comportant de l'IL-1 β , du TNF- α , de l'IL-6 et des prostaglandines E2, ne permet pas la production d'IL-12, nécessaire à l'induction d'une réponse cellulaire Th1 (67).

Récemment l'application du transfert de gènes à la vaccination par CD a permis de nouvelles avancées. La transfection consiste à introduire du matériel génétique exogène dans des cellules eucaryotes. La technique la plus utilisée dans le cadre de la vaccination par CD dans la littérature est l'électroporation. Cette technique consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires qui sont ainsi déstabilisées. Le matériel génétique alors présent dans l'espace extracellulaire peut rentrer dans les cellules. L'électroporation permet ainsi d'incorporer de l'acide

ribonucléique (ARN) messenger codant pour les protéines CD40, TLR 4 et CD70 au sein des CD afin d'induire leur maturation (71–73). Les CD ainsi obtenues sont capables de stimuler les LT de façon 200 fois plus importante que les CD obtenues avec un cocktail de maturation classique (74).

3. Chargement antigénique des cellules dendritiques

Pour charger les CD en antigènes tumoraux plusieurs techniques ont été proposées.

Les CD peuvent être chargées via un lysat de cellules tumorales. Cette technique présente comme avantage d'induire une réponse immune polyclonale contre des antigènes tumoraux cachés ou inconnus. Cependant, elle nécessite d'avoir accès aux cellules tumorales du patient et d'établir au préalable une culture de cellules tumorales autologues. Une perspective pourrait être de développer des lignées allogéniques standardisées afin d'uniformiser le traitement (17,75).

Les CD peuvent également être chargées via des peptides synthétiques spécifiques comme la glycoprotéine 100 ou la tyrosinase. Avec cette technique il n'est pas nécessaire d'effectuer un prélèvement tumoral préalable, de plus il est possible de réaliser un suivi immunologique des LT spécifiques. Par contre cette technique présente plusieurs limites : la nécessité d'un typage HLA du patient, l'induction d'un nombre réduit de clones lymphocytaires T, le risque d'immunosélection de variants tumoraux CMH I négatif ou de perte d'épitopes (17,76).

D'autres équipes ont proposé de fusionner des CD et des cellules tumorales. Malgré des résultats initiaux encourageants, cette stratégie reste limitée en pratique clinique (44,77,78).

Plus récemment il a été proposé de charger les CD en incorporant l'ARN des antigènes tumoraux directement dans les CD par électroporation (79). Cette technique présente comme avantages une réduction du coût et du temps de préparation et une réponse immune des LT CD4 et CD8 indépendante du système HLA (19).

Le chargement antigénique in vivo consiste à injecter les CD non chargées en antigènes tumoraux au sein de la tumeur afin que le chargement antigénique se fasse de façon physiologique in vivo.

Une étude réalisée chez des souris présentant une tumeur pulmonaire préalablement irradiée rapporte une supériorité du chargement antigénique in vivo par rapport au chargement antigénique par électroporation. Selon cette étude le chargement antigénique in vivo permettrait une meilleure efficacité de la vaccination par CD en terme de survie, de ralentissement de la croissance tumorale et de sécrétion d'IFN- γ (80).

Des approches plus personnalisées ont également été développées très récemment grâce à l'analyse génétique de la tumeur. Ainsi, les peptides tumoraux chargés peuvent être sélectionnés selon la présence de mutation au sein de leurs ADN. La vaccination par CD chargées avec les peptides mutés permettrait une meilleure réponse des LT cytotoxiques que lors de la vaccination par CD chargées avec les mêmes peptides sauvages (81).

4. Voie d'administration des cellules dendritiques

Plusieurs études ont été menées afin de trouver la meilleure voie d'administration du vaccin. L'injection intradermique est décrite comme plus efficace que l'injection sous-cutanée, l'injection intra-veineuse ou l'injection intraganglionnaire (71,82,83)(84,85).

5. Migration des cellules dendritiques

La migration des CD aux ganglions lymphatiques est un paramètre indispensable pour l'efficacité de la vaccination par CD. Erik H.J.G. *et al.* ont mis en évidence une amélioration de la vaccination par CD si l'injection contenait moins de 5×10^6 CD (86).

C. Résultats de la vaccination par cellules dendritiques

Plusieurs essais ont montré une bonne innocuité de la vaccination par CD (51,53,54,87,88). Les effets indésirables décrits sont d'intensité légère voire modérée avec essentiellement une douleur, un prurit au point d'injection voire un rash à distance. Aucun effet indésirable sévère n'est décrit dans la littérature (67). De plus aucun effet négatif sur la qualité de vie n'a été mis en évidence dans une étude portant sur 55 patients présentant un cancer rénal métastatique (89).

Une réponse biologique des LT spécifiques a été mise en évidence dans de nombreuses études (53,87,88,90)(79). De façon plus inattendue, cette réponse immune peut également être retrouvée chez des patients présentant une maladie métastatique évoluée, suggérant la même sensibilité du système immunitaire de ces patients aux immunothérapies (91). De plus la vaccination par CD entraîne une diversification du répertoire des récepteurs des cellules T (TCR) élargissant ainsi la réponse immune antitumorale (81).

On observe dans la plupart des essais contrôlés, une augmentation de la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique traités par vaccination de CD. En moyenne la survie globale augmentait de 20 % (67). Les groupes contrôles étaient traités par dacarbazine, vaccination de peptides tumoraux ou placebo (67).

Cependant le taux de réponse objective reste faible, estimé à 8,5 %, avec de rares rémissions cliniques (67).

D. Limites actuelles et stratégies d'optimisation de la vaccination par cellules dendritiques

Les résultats des études de vaccination par CD sont encourageants mais encore modestes chez les patients atteints de mélanome métastatique. Les protocoles de vaccination semblent encore imparfaits et nécessitent d'être améliorés.

On constate un échappement tumoral pouvant être expliqué par la faible immunogénicité des antigènes tumoraux utilisés *in vitro*, la perte des antigènes spécifiques à la surface des cellules tumorales, l'établissement d'une réponse de tolérance induite par les tumeurs via une forte activation de la population cellulaire T régulateurs, de faibles capacités immunostimulantes des CD utilisées et la mort des CD injectées.

Dans l'objectif d'améliorer l'efficacité de la vaccination par CD, plusieurs stratégies peuvent être mises en place afin d'augmenter l'intensité de la réponse immune, de contrer l'immunosuppression associée aux tumeurs, d'augmenter la susceptibilité immunologique des cellules tumorales ou de diminuer la charge tumorale. De plus plusieurs stratégies sont également développées afin d'optimiser les CD utilisées pour la vaccination en améliorant notamment leur capacité de survie, leur capacité à capter les antigènes et leur capacité immunostimulante (19,67).

V. Rationnel de l'essai clinique associant la vaccination par cellules dendritiques à des traitements par imiquimod topique et cyclophosphamide

Nous avons réalisé un essai clinique visant à évaluer l'efficacité d'une immunisation avec des CD autologues de type CD-I3 maturées in vivo au sein de métastases cutanées préalablement traitées par de l'imiquimod topique en association à un traitement par cyclophosphamide chez les malades atteints de mélanome métastatique.

L'enjeu de ce travail est de parvenir à induire une réponse immunitaire antitumorale systémique ciblant l'ensemble des lésions tumorales notamment à distance des lésions cibles.

En vue d'améliorer l'efficacité de la vaccination par CD, nous avons proposé, dans cet essai, plusieurs stratégies d'optimisation de ce traitement. Nous avons choisi d'utiliser des CD-I3 qui étaient chargées in vivo directement au sein de métastases cutanées afin de rendre le vaccin plus immunogène. Nous avons également associé la vaccination par CD à l'application cutanée d'imiquimod, afin d'augmenter l'intensité de la réponse immune, et au cyclophosphamide afin de contrer l'immunosuppression associée à la tumeur.

A. Chargement des cellules dendritiques in vivo

Le chargement des CD in vivo directement au sein de métastases cutanées permet d'utiliser des antigènes pertinents puisque exprimés par la tumeur du patient. Le chargement de ces antigènes se réalise de façon « physiologique » et non par un phénomène de compétition comme habituellement avec le chargement par peptides. En chargeant les CD in vivo, le nombre de peptides chargés est multiplié. Les chances d'induire l'activation de clones lymphocytaires T cytotoxiques spécifiques de

la tumeur sont donc également multipliées. Plusieurs essais cliniques ont mis en évidence des résultats satisfaisants avec cette technique (92–94).

B. Imiquimod

L'imiquimod est une molécule immunostimulante qui possède une action antivirale et antitumorale et qui a obtenu une AMM dans la prise en charge des condylomes externes, des carcinomes baso-cellulaires superficiels et des kératoses actiniques. L'imiquimod, appartenant à la classe des imidazo-quinolines, est un agoniste du TLR 7 induisant la synthèse et la libération de cytokines et notamment d'IFN- α , de TNF- α et d'IL-6 / 8 / 12 (95). L'application cutanée d'imiquimod conduit localement au niveau de la tumeur à une réaction inflammatoire et une réaction tumoricide (96). Elle induit une maturation fonctionnelle, une activation des CD et les protège de l'apoptose. Cette association pourrait favoriser le chargement et la présentation des antigènes tumoraux par les CD, leur migration vers les ganglions de drainage et finalement une réponse lymphocytaire antitumorale systémique spécifique (96–100).

Dans la littérature, les résultats des essais de vaccination par CD couplée à l'imiquimod dans des modèles murins semblent prometteurs. En effet il est mis en évidence une diminution de la croissance tumorale, une augmentation de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires et notamment les CD et une amélioration de la migration des CD aux ganglions lymphatiques (100,101). Une augmentation de la survie est mise en évidence chez des patients présentant un glioblastome lorsque l'imiquimod est associé à la vaccination par CD (102). Par ailleurs il a été mis en évidence que l'application topique transcutanée d'imiquimod apportait des résultats supérieurs à son injection intradermique (103).

C. Cyclophosphamide

Sachant que la population des LT régulateurs est un frein important à l'efficacité de l'immunothérapie antitumorale, la vaccination par CD était associée à un traitement par cyclophosphamide métronomique connu pour inhiber la population des LT régulateurs. Le cyclophosphamide est un agent alkylant utilisé depuis

plusieurs années en chimiothérapie anticancéreuse. Il a été observé que de faibles doses répétées régulièrement de cyclophosphamide permettaient une réduction du taux de LT régulateurs circulants restaurant ainsi la prolifération des LT périphériques et augmentant l'activité des NK (104–106).

L'intérêt de l'association de la vaccination par CD au cyclophosphamide chez des patients présentant un mélanome métastatique est confirmé dans deux essais retrouvant une stabilité de la maladie chez 57 % des patients (105) et un bénéfice clinique chez 42 % des patients (106).

D. Etude préclinique

Nous avons en premier lieu mené une étude préclinique afin d'évaluer les caractéristiques des CD-I3 *in vitro* et l'intérêt de leur association à l'imiquimod pour l'optimisation de la vaccination (107). Les capacités migratoires des CD-I3 et l'influence de l'imiquimod étaient également étudiées *in vivo* chez la souris.

Les CD-I3 présentaient des caractéristiques plasmacytoïdes notamment en terme d'expression des TLR (7 et 8), de migration et de relargage d'IFN- α . Les CD-I3 étaient capables de stimuler les LT et d'induire une réponse immune antitumorale.

Nous avons par ailleurs mis en évidence qu'*in vitro* l'imiquimod modifiait le phénotype des CD-I3 en augmentant les marqueurs de différenciation (CD 123) et de maturation (HLA DR, CD80, CD86). De plus, l'imiquimod retardait l'apparition de l'apoptose des CD-I3. A des faibles concentrations (10 μ M) l'imiquimod majorait la prolifération lymphocytaire induite par les CD. Enfin l'imiquimod permettait d'améliorer franchement la migration des CD *in vitro* et *in vivo*. Les CD étaient en effet retrouvées en quantité nettement plus importante dans les ganglions lymphatiques et dans les rates des souris lorsque la vaccination était associée à l'application d'imiquimod (Figure 4).

Au vu de ces résultats, les CD-I3 apparaissaient comme de bons candidats pour les essais de vaccination par CD et l'association à l'imiquimod semblait prometteuse puisqu'elle améliorait les capacités immunologiques des CD-I3 (107).

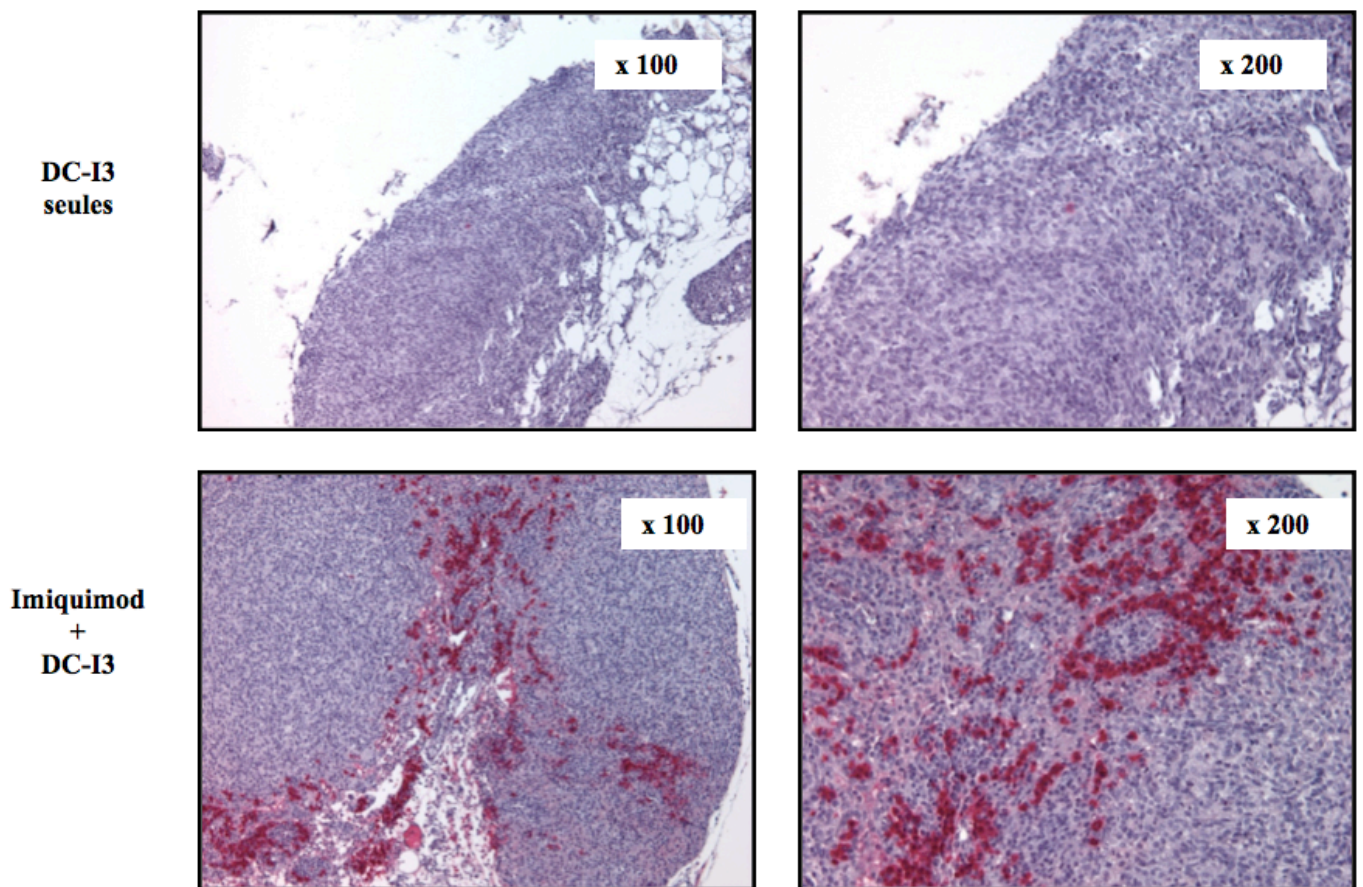


Figure 4 : Immunomarquage des CD-13 au sein des ganglions lymphatiques de souris après vaccination par CD-13 associée ou non à l'application d'imiquimod (107)

E. Objectifs de l'étude

Nous nous sommes intéressés à l'optimisation de la vaccination par CD dans le mélanome métastatique. Nous avons évalué une vaccination à base de CD autologues de type CD-13 par injection intra-tumorale au sein de métastases cutanées préalablement traitées par de l'imiquimod topique en association à un traitement par cyclophosphamide chez des patients atteints de mélanome métastatique. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la réponse clinique des patients selon les critères RECIST de façon prospective. Les objectifs secondaires étaient d'une part l'évaluation prospective de la toxicité et de l'effet du protocole sur la population des LT régulateurs ; d'autre part l'évaluation rétrospective de la survie des patients, de l'effet du protocole sur l'infiltrat lymphocytaire au sein de métastases cutanées en histologie et de la corrélation entre la réponse clinique et différents paramètres biologiques.

MATERIELS ET METHODES

I. Objectifs de l'étude

Notre travail visait à évaluer un protocole d'immunisation avec des CD autologues générées à partir de cellules mononuclées du sang périphérique en présence d'IL-3 et d'IFN- β et maturées in vivo au sein de métastases cutanées préalablement traitées par de l'imiquimod topique, associée à un traitement par cyclophosphamide chez des patients atteints de mélanome métastatique.

L'objectif principal de notre travail était d'évaluer la réponse clinique des patients selon les critères RECIST de façon prospective.

Les objectifs secondaires étaient d'évaluer de façon prospective :

- l'effet du protocole sur la population des LT régulateurs au niveau sanguin
- la toxicité du protocole

De plus nous avons évalué de façon rétrospective :

- la survie globale et la survie sans progression des patients
- l'effet du protocole sur l'infiltrat lymphocytaire au sein de métastases cutanées en histologie
- la corrélation entre la réponse clinique et les paramètres biologiques suivants : les taux sanguins de protéine C réactive (CRP), de lactate déshydrogénase (LDH), de lymphocytes, de polynucléaires éosinophiles et le rapport polynucléaires neutrophiles / lymphocytes.

II. Méthodologie de l'essai

Nous avons réalisé une étude prospective ouverte de phase II, monocentrique, dans le service de Dermatologie du CHRU de Lille, chez des patients atteints de mélanome métastatique entre mai 2010 et août 2013.

III. Patients

A. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion des patients étaient :

- Patient âgé de 18 ans ou plus
- Mélanome à un des stades AJCC suivants :
 - Maladie métastatique régionale non résecable (tout T; N2c ou N3; M0)
 - Maladie métastatique distante avec un taux de LDH normal (tout T; tout N; M1a, M1b ou M1c)
- Au moins une lésion tumorale mesurable selon les critères RECIST (plus long diamètre mesurable supérieur ou égal à 10 mm sur un scanner spiralé)
- Au moins 2 métastases cutanées de mélanome mesurant au moins 5 mm de diamètre pouvant être utilisées comme site de vaccination
- Survie estimée à au moins 3 mois
- Statut de performance établi par l'OMS de 0 ou 1
- Maximum d'une ligne de chimiothérapie systémique terminée depuis au moins 4 semaines
- Aucune immunothérapie dans le passé à l'exception de l'IFN- α ou de l'IL-2 (dans ce cas, le traitement devra avoir été achevé depuis au moins 4 semaines)
- Paramètres biologiques :
 - Hémoglobine supérieure à 10 g/dL

- Globules blancs supérieurs à 1500/ μ L
- Lymphocytes supérieurs à 700/ μ L
- Plaquettes supérieures à 100000/ μ L
- Créatinine sérique inférieure à la limite supérieure de la normale
- Transaminases inférieures à 2 fois la limite supérieure de la normale
- LDH inférieure à la limite supérieure de la normale
- Sérologies de la syphilis, des hépatites B, C et du virus de l'immunodéficience humaine négatives
- Patient bénéficiant d'une contraception pendant la période de vaccination
- Patient capable et disposé à donner son consentement éclairé écrit
- Patient disposé à coopérer pendant toute la période de l'étude
- Accès veineux adéquat disponible pour la réalisation de la cytophérèse

B. Critères de non inclusion

Les critères de non inclusion des patients étaient :

- Présence de métastases cérébrales et/ou méningées
- Autre pathologie médicale et/ou chirurgicale significative et évolutive en cours et/ou traitement qui interfère avec la réalisation de l'étude
- Maladie auto-immune nécessitant un traitement médical, à l'exception du vitiligo
- Maladie concomitante nécessitant un traitement par corticostéroïdes et/ou anti inflammatoire non stéroïdien
- Autre cancer diagnostiqué dans les 5 ans précédents l'entrée dans cette étude, à l'exception des carcinomes basocellulaires traités et des carcinomes cervicaux in situ
- Trouble mental pouvant compromettre la capacité de donner le consentement éclairé
- Impossibilité de se soumettre au suivi médical de l'étude pour des raisons géographiques, sociales ou psychiques
- Participation à toute autre étude clinique impliquant d'autres agents d'investigation pendant les quatre semaines précédents l'inclusion
- Grossesse ou allaitement

IV. Description des traitements administrés

A. Cyclophosphamide

Le patient recevait un traitement par cyclophosphamide à la posologie de 100 mg par jour par voie orale en une prise le matin à jeun. Le patient bénéficiait de ce traitement une semaine sur deux pendant un mois. Ce schéma était proposé au début des trois premiers cycles puis avant chaque vaccination pour les cycles suivants.

B. Imiquimod

Un traitement par imiquimod crème 5 % était appliqué sur les sites de vaccination une fois par jour le soir 5 jours avant et 2 jours après chaque vaccination. Si le patient présentait d'autres métastases cutanées, un traitement par imiquimod pouvait également être appliqué selon les mêmes modalités.

C. Cellules dendritiques

Pour la préparation des CD-I3, le patient bénéficiait d'une cytophérèse afin d'obtenir un concentré de globules blancs. A partir du produit de cytophérèse, les monocytes étaient purifiés grâce à un système fermé. Les cellules de la cytophérèse étaient lavées afin de retirer le plasma riche en plaquettes puis mises en adhérence dans des cell factory pendant 2 heures à 37°C. Les cellules non adhérentes étaient retirées par des lavages des cell factory. Quant aux cellules adhérentes, elles étaient mises en culture en présence de milieu X-VIVO 20 supplémenté en cytokines IL-3 et IFN- β pendant 5 jours. Le 2ème ou le 3ème jour de culture les cytokines IL-3 et IFN- β étaient ajoutées aux cellules dans les cell factory. Au 5ème jour de culture les cellules obtenues étaient récoltées.

A ce stade les critères d'acceptation des CD générées étaient :

- Nombre de CD vivantes supérieures à 180×10^6
- Viabilité des CD supérieure à 80 %
- Pourcentage de cellules contaminantes (monocytes, lymphocytes)

inférieur à 50 %

Puis les cellules étaient congelées en poche cryocyte à -80°C à 15 millions de CD par poche. Un minimum de 12 cryocytes étaient congelées : 9 pour les vaccinations et 3 en cas d'échec de la préparation cellulaire après décongélation.

Le jour de la vaccination, une poche de CD était décongelée à la plate forme de biothérapie.

A cette étape, les critères libérateurs du produit de thérapie cellulaire étaient :

- Nombre de CD vivantes pour une injection supérieur à 10×10^6
- Viabilité des CD décongelées doit être supérieure à 70 %
- Gram négatif

Après un lavage, les cellules étaient mises dans deux seringues de 0,5 mL. Le produit cellulaire devait être administré dans les 2 heures qui suivaient la mise en seringue. 10 millions de CD-13 étaient alors injectés, répartis en 2 sites d'injection préalablement définis et inchangés au cours du protocole (Figure 5).

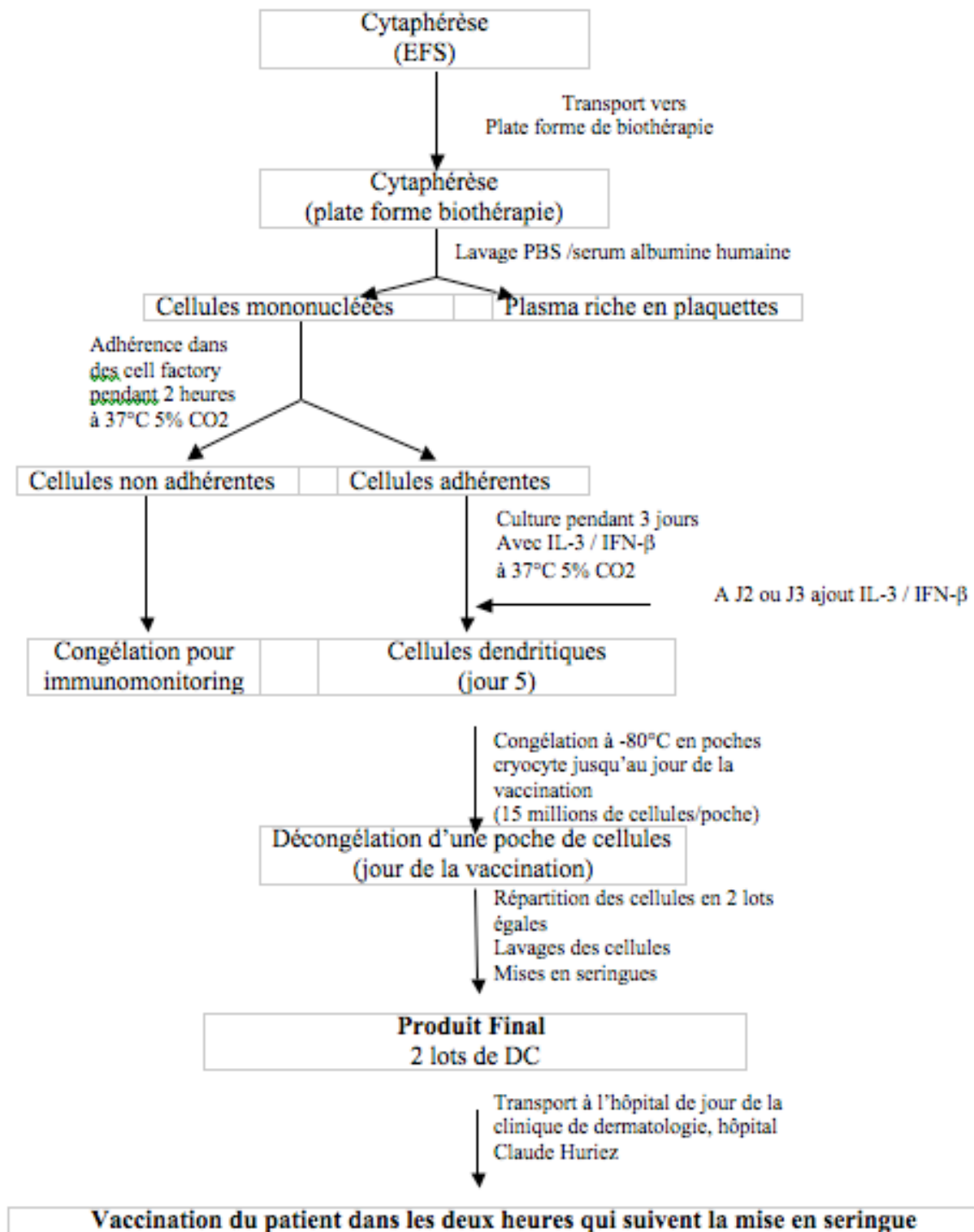


Figure 5 : Procédé de production des CD

V. Contrôle de la qualité des produits

Le produit de cytophérèse subissait un contrôle bactériologique par une hémoculture pédiatrique aérobie dès son arrivée au site de production. Un contrôle complet, de la stérilité et de la qualité du produit, était effectué au terme de la culture des CD, avant leur congélation et lors de leur décongélation, avant la vaccination :

- un contrôle microbiologique par une coloration de Gram et des hémocultures aérobie et anaérobie par le laboratoire de bactériologie
- un contrôle mycoplasme par le laboratoire de bactériologie
- un contrôle des levures et champignons par le laboratoire de myco/parasitologie
- une évaluation du pourcentage de cellules contaminantes (monocytes non différenciés, lymphocytes)
- un contrôle phénotypique par cytométrie en flux (marqueur CD1a, HLA-DR, CD80, CD86, CCR7, CD123)
- un contrôle de l'état apoptotique des cellules par la mesure du potentiel de membrane mitochondriale avec la 3,3'-dihexyloxycarbocyanine en cytométrie en flux
- un contrôle de viabilité par le bleu trypan lu au laboratoire
- un contrôle de la capacité des CD générées à activer les LT CD4 naifs allogéniques par mixed lymphocyte reaction assay.

VI. Déroulement de l'étude

Au cours de la visite de pré inclusion, un bilan général du patient était réalisé :

- Antécédents du patient et traitements antérieurs
- Prise de médicament concomitant
- Histoire du mélanome
- Évaluation des signes vitaux (taille, tension artérielle, fréquence cardiaque, poids et température)
- Indice de performance (OMS)
- Electrocardiogramme (devant être réalisé dans les 4 semaines précédant l'inclusion)
- Test de grossesse si justifié
- Bilan biologique : numération formule sanguine, plaquettes, bilan hépatique complet, créatininémie, LDH, sérologies de la syphilis, des hépatites B, C et du virus de l'immunodéficience humaine, bilan de coagulation, anticorps anti-nucléaires
- Bilan d'imagerie (devant être réalisé dans les 4 semaines précédant l'inclusion): scanner thoraco abdomino pelvien et cérébral.

Si le patient présentait tous les critères d'éligibilité et acceptait le protocole en signant un consentement éclairé, l'investigateur procédait à l'inclusion du patient. Un calendrier de vaccination était alors établi.

Le protocole était séparé en plusieurs cycles comprenant chacun trois vaccinations. Une semaine avant le début du protocole, une cytophérèse était réalisée afin de recueillir les cellules mononuclées du sang périphérique nécessaires à la préparation des CD pour 9 vaccinations soit les 3 premiers cycles du protocole. Lors du premier cycle de vaccination, un traitement par cyclophosphamide était administré durant les semaines 1 et 3. Les vaccinations de CD étaient réalisées durant les semaines 4, 6 et 8. A la semaine 10 un bilan d'évaluation de la maladie était réalisé. Les deuxième et troisième cycles étaient identiques au premier cycle. Pour la réalisation du quatrième cycle, une nouvelle cytophérèse était nécessaire et réalisée à la semaine 29. Le traitement par cyclophosphamide était alors proposé avant chaque vaccination, soit aux semaines 30, 32, 38, 40, 46, 48. Les vaccinations étaient réalisées aux semaines 33, 41, 49. Un bilan d'évaluation de la maladie était réalisé après chaque vaccination, soit aux semaines 36, 44, 52. Lors du cinquième cycle, les vaccinations étaient réalisées tous les trois mois soit aux semaines 65, 78 et 91. Le traitement par cyclophosphamide était administré selon les mêmes modalités avant chaque vaccination (Figure 6).

Un bilan biologique hématologique, biochimique, d'hémostase et un bilan immunologique étaient réalisés une semaine avant le début du protocole, lors de chaque vaccination et lors de chaque évaluation de la maladie. Les prélèvements histologiques n'étaient pas réalisés de façon systématique mais en fonction de l'évolution clinique de chaque patient.

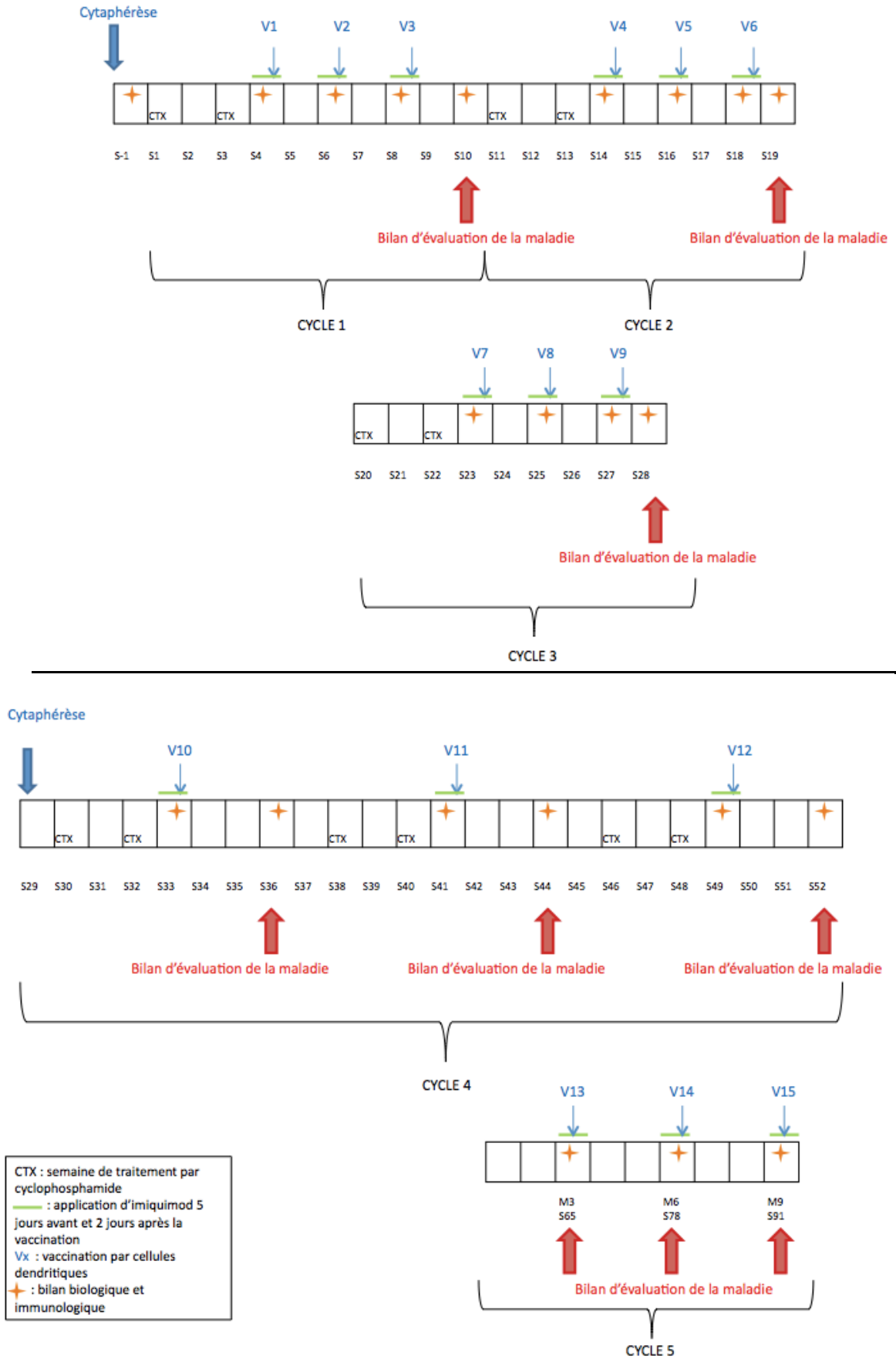


Figure 6 : Déroulement du protocole de vaccination par CD

VII. Evaluation du protocole

A. Critère de jugement principal

Le critère de jugement principal était la réponse clinique évaluée selon les critères RECIST. Une évaluation initiale des métastases était effectuée avant le début du protocole de vaccination. Les lésions mesurables les plus volumineuses étaient identifiées comme lésions cibles. Chaque lésion cible cutanée était mesurée et documentée par un cliché photographique en couleur. Durant l'étude, la réponse clinique était évaluée par de nouveaux bilans aux semaines 10, 19, 28, 36, 44 et 52. Les lésions cibles étaient évaluées par la somme de leurs plus grands diamètres et comparées aux mesures initiales selon les critères RECIST.

La réponse clinique était définie par :

- Une réponse complète : disparition de toutes les lésions cibles
- Une réponse partielle : diminution d'au moins 30 % de la taille de chaque lésion cible
- Une progression tumorale : augmentation d'au moins 20 % de la taille de chaque lésion cible ou apparition d'une ou de plusieurs nouvelles lésions
- Une stabilité tumorale : diminution tumorale insuffisante pour définir une réponse partielle et/ou augmentation tumorale inférieure à celle nécessaire pour définir une progression tumorale

La plupart des réponses cliniques dans les études précédentes ayant été enregistrées avec un décalage de plusieurs semaines, un statut de progression lente de la maladie était défini comme suit (tous les critères devant être respectés) :

- 1) Le statut de performance du patient doit être égal à 0 ou 1
- 2) La valeur de LDH du patient ne doit pas être supérieure à 2 fois la limite supérieure de la normale
- 3) Pas d'apparition de nouvelles lésions viscérales autres que pulmonaires

Les patients présentant une progression lente de la maladie pouvaient continuer le protocole.

B. Critères de jugement secondaires

1. L'effet du protocole sur la population des lymphocytes T régulateurs au niveau sanguin

L'analyse de la population des LT régulateurs était effectuée par cytométrie en flux au niveau sanguin avant le début du traitement, à chaque vaccination et à chaque bilan d'évaluation. Les cellules sanguines étaient marquées par des anticorps anti CD4, CD25, CD127, foxp3. La population des LT régulateurs était caractérisée par le phénotype suivant : CD4+, CD25high, foxp3+, CD127-.

Le traitement par cyclophosphamide était considéré comme efficace si le pourcentage de LT régulateurs parmi les cellules T CD4+ diminuait au moins d'un facteur 2 entre l'analyse initiale et l'analyse à la semaine 4 (104).

2. La toxicité du protocole

Afin de s'assurer de l'innocuité du protocole, les patients étaient traités en hospitalisation de jour dans le service de Dermatologie. Une observation de 2 heures après la première injection était réalisée avec une surveillance de la tension artérielle, du pouls et la température toutes les 30 minutes. La surveillance pouvait être poursuivie jusqu'à 4 heures après l'injection si les paramètres vitaux étaient modifiés. Si la tolérance était satisfaisante, la surveillance était ramenée à une heure pour les injections suivantes. Une auto surveillance de la température et des éventuels symptômes était réalisée par le patient pendant les 6 jours suivants chaque vaccination et consignée dans un carnet d'observation, remis lors de la vaccination. La prise de médicaments était également consignée.

La toxicité était évaluée selon l'échelle du National cancer Institute CTC (version 3.0, 2003).

- Léger (grade 1) : L'événement indésirable était remarqué par le patient et n'interférait pas avec les activités quotidiennes, mais pouvait nécessiter une autre médication
- Modéré (grade 2) : L'événement indésirable interférait avec les activités quotidiennes du patient, pouvait entraîner des thérapies additionnelles ou une réduction de dose, mais ne nécessitait pas le retrait du patient à l'étude.
- Sévère (grade 3) : L'événement indésirable était intolérable et nécessitait des thérapies additionnelles ou la réduction de dose du produit
- Létale (grade 4) : L'événement indésirable entraînait un danger de mort pour le patient

3. La survie globale des patients

De façon rétrospective, nous avons analysé la survie globale et la survie sans progression des patients. La survie globale était définie par le délai entre l'inclusion dans le protocole et le décès du patient quel qu'en soit la cause. La survie sans progression était définie par le délai entre l'inclusion dans le protocole et la survenue d'un événement considéré comme une progression de la maladie selon les critères RECIST.

4. L'effet du protocole sur l'infiltrat lymphocytaire au sein de métastases cutanées en histologie

De façon rétrospective, nous avons analysé les prélèvements de métastases cutanées en histologie. Un médecin anatomopathologiste spécialisé en Dermatologie a comparé les prélèvements réalisés avant le protocole de vaccination aux prélèvements réalisés pendant ou après le protocole. La localisation et l'intensité de l'infiltrat lymphocytaire étaient analysées sur une coloration hématoxyne-éosine-safran (HES). La localisation de l'infiltrat était classée en intratumorale, péri-tumorale ou à distance. L'intensité de l'infiltrat lymphocytaire était estimée comme faible, modérée ou intense en comparaison à l'intensité de l'infiltrat tumoral adjacent. Puis des marquages en immunohistochimie avec les anticorps CD79a, CD3 et CD8 étaient effectués afin de caractériser respectivement l'infiltrat de lymphocytes B, de LT et de LT CD-8.

5. La corrélation entre la réponse clinique et différents paramètres biologiques

6.

Un bilan biologique était réalisé avant le début du traitement, lors de chaque vaccination et lors de chaque évaluation. Nous avons choisi d'explorer des paramètres biologiques déjà évalués comme facteurs prédictifs d'efficacité de l'ipilimumab. Dans la littérature, l'efficacité de l'ipilimumab était corrélée à une diminution des LDH et de la CRP, à une augmentation de la valeur absolue des lymphocytes (108), à une augmentation des polynucléaires éosinophiles à plus de 100/ μ L (109). Le rapport des polynucléaires neutrophiles sur les lymphocytes était corrélé à une meilleure survie s'il était inférieur à la médiane (110).

Nous avons étudié de façon rétrospective les taux sanguins de CRP, de LDH, de lymphocytes, de polynucléaires éosinophiles et le rapport des polynucléaires neutrophiles sur les lymphocytes. Nous avons recherché une corrélation entre la variation de ces paramètres et la réponse clinique au protocole de vaccination.

VIII. Considérations éthiques

Avant l'inclusion du patient dans l'étude, des informations orales et écrites complètes et loyales lui étaient fournies.

Un des investigateurs était chargé d'informer le patient à propos :

- de l'objectif de l'essai, de sa méthodologie, de sa durée,
- des bénéfices attendus, des contraintes et risques prévisibles, des mesures de sécurité mises en œuvre,
- de la possibilité de refuser, de retirer son consentement à tout moment sans préjudice personnel,
- de l'avis du Comité de Protection des Personnes

Le patient bénéficiait d'un délai de réflexion avant de signer un consentement libre et éclairé avant la visite d'inclusion.

Le protocole d'étude clinique, le modèle de consentement et d'information du patient étaient soumis au Comité de Protection des Personnes et un accord favorable était obtenu le 16 septembre 2008.

Selon la déclaration d'Helsinki et les bonnes pratiques cliniques, un patient avait le droit d'abandonner l'étude à tout moment pour n'importe quelle raison sans préjudice sur ces traitements médicaux futurs.

RESULTATS

I. Description des cas

Nous avons inclus 5 patients dans ce travail entre mai 2010 et août 2013 (Tableau II).

Il s'agissait de 2 hommes et 3 femmes. L'âge moyen des patients au moment du diagnostic de mélanome était de 65 ans (extrêmes : 40 - 75). Pour 4 patients sur 5 le mélanome primitif était localisé au membre inférieur. Pour un patient le mélanome primitif n'était pas retrouvé. L'indice de Breslow moyen était de 2,4 mm (extrêmes : 0,54 - 3,4). Lors du diagnostic initial, la maladie était classée T1 N0 pour un patient, T3 N0 pour 2 patients, T3 N1 pour un patient et M1 pour un patient.

La maladie métastatique apparaissait en moyenne 3 ans et 4 mois après le diagnostic de mélanome (extrêmes : d'emblée - 5 ans et 6 mois). L'ensemble des patients présentait des métastases cutanées. Les autres localisations des métastases étaient ganglionnaire pour 3 patients, osseuse pour 2 patients, cérébrale pour un patient et hépatique pour un patient.

Pour 2 patients, ce protocole de vaccination était le premier traitement de la maladie métastatique entrepris. Trois patients avaient bénéficié d'autres traitements de la maladie métastatique avant l'inclusion dans ce protocole de vaccination. Il s'agissait d'un curage ganglionnaire pour 2 patients, d'IFN- α pour 2 patients, de radiothérapie pour un patient et d'application d'imiquimod et de 5-FU topique pour un patient.

Après la fin de ce protocole de vaccination, les patients bénéficiaient de différents traitements : témozolomide (témodal) pour 4 patients, cyclophosphamide pour 3 patients, exérèses chirurgicales de nodules de perméation pour 3 patients, ipilimumab pour 2 patients, imiquimod topique pour 2 patients, IFN- α pour 2 patients, radiothérapie pour 2 patients, anti-RAF pour un patient, gammaknife pour un patient, dacarbazine pour un patient et 5-FU topique pour un patient.

	PATIENT 1	PATIENT 2	PATIENT 3	PATIENT 4	PATIENT 5	Moyenne	
Sexe	H	F	H	F	F	F : 3/5 H : 2/5	
Age lors du diagnostic (années)	40	69	75	72	68	65	
Mélanome	Type	Nodulaire	SSM	SSM	nd	/	
	Localisation	Mollet droit	Mollet droit	Sous malléolaire interne gauche	nd	Face interne jambe gauche	Membre inférieur 4/4
	Indice de Breslow (mm)	2,5	3,4	3,1	nd	0,54	2,4
	Stade initial	T3a N1a M0 (IIIA)	T3b N0 M0 (IIB)	T3b N0 M0 (IIB)	Tx N1b M1a (IV)	T1b N0 M0 (IB)	T1 N0 : 1/5 T3 N0 : 2/5 T3 N1 : 1/5 M1 : 1/5
Maladie métastatique	Délais d'apparition	7 ans et 10 mois	1 an et 6 mois	5 ans et 6 mois	d'emblée	2 ans	3 ans et 4 mois
	Localisation	Ganglionnaire Cutanées Cérébrales	Cutanées Hépatiques	Ganglionnaires Cutanées Osseuses	Cutanées Ganglionnaire Osseuses Disséminées	Cutanées	cutanées : 5/5 ganglionnaire : 3/5 osseuse : 2/5 cérébrale : 1/5 hépatique : 1/5
Traitements reçus avant le protocole	Curage inguinal IFN	0	Curage ilio-inguinal Radiothérapie ilio-inguinale	0	Exérèses de NP IFN IFN + Imiquimod + 5FU	O : 2/5 Curage : 2/5 IFN : 2/5 Radiothérapie : 1/5 Imiquimod / 5-FU : 1/5	
Traitements reçus après le protocole	Ipilimumab + CTX Exérèses de NP Vémurafénib Gammaknife + Témodal Dabrafénib	Imiquimod + CTX Imiquimod + CTX + IFN Témodal	Radiothérapie CTX + Ipilimumab Témodal + ipilimumab	Exérèses de NP Radiothérapie Dacarbazine Témodal	Exérèses de NP IFN + Imiquimod + 5FU	Témodal : 4/5 CTX : 3/5 Exérèses : 3/5 Ipilimumab : 2/5 Imiquimod : 2/5 IFN : 2/5 Radiothérapie : 2/5 Anti-RAF : 1/5 Gammaknife : 1/5 Dacarbazine : 1/5 5-FU : 1/5	

Tableau II : Description clinique des patients

CTX : cyclophosphamide

F : femme

H : homme

IFN : interféron- α

nd : donnée non disponible

NP : nodule de perméation

SSM : spreading superficial melanoma

0 : aucun

II. Réponse clinique

Deux patients (patients 1 et 3) ont présenté une progression durant le protocole de vaccination. Une patiente (patiente 2) a présenté une stabilité de la maladie, une patiente (patiente 4) a présente une progression lente de la maladie et une patiente (patiente 5) a présenté une réponse partielle (Tableau III).

Le patient 1 présentait 4 lésions secondaires cutanées, sans atteinte viscérale, lors de l'inclusion dans ce protocole de vaccination. La lésion cible 1 était localisée à la face externe de la cuisse droite et mesurait 7 mm de diamètre. La lésion cible 2 était localisée à la face interne du tiers inférieur de la cuisse droite et mesurait 5 mm de diamètre (Figure 7). Ces 2 lésions cibles correspondaient également aux sites de vaccinations. Après une stabilité initiale de la maladie, 2 nouveaux nodules de perméation apparaissaient lors des quatrième et sixième vaccinations. A la quatrième vaccination la taille de la lésion cible 2 augmentait de plus de 20 % de sa taille initiale. La lésion cible 1 restait stable. Devant cette progression de la maladie le protocole était arrêté après 9 vaccinations.

La patiente 2 présentait 8 lésions secondaires cutanées, sans atteinte viscérale, lors de l'inclusion dans ce protocole de vaccination. La lésion cible 1 était localisée en regard de la cicatrice d'exérèse du mélanome primitif et mesurait 20 mm de diamètre. La lésion cible 2, pré-tibiale droite, mesurait 8 mm de diamètre (Figure 8). Ces 2 lésions cibles correspondaient également aux sites de vaccinations et étaient stables tout au long du protocole. Malgré une majoration initiale du nombre de lésions non cibles, à la neuvième vaccination 3 lésions non cibles avaient disparu par rapport à l'évaluation initiale. Cette régression était constatée cliniquement et en histologie. Selon les critères RECIST, les lésions cibles étant stables, la maladie était considérée comme stable, cependant on observait une disparition de lésions non cibles et une diminution de la masse tumorale globale.

Le patient 3 présentait 4 lésions secondaires cutanées sans atteinte viscérale lors de l'inclusion dans notre protocole. La lésion cible 1 était localisée à la face externe de la cuisse gauche et mesurait 7 mm de diamètre. La lésion cible 2 était localisée au creux inguinal gauche et mesurait 40 mm de diamètre (Figure 9). Ces 2 lésions cibles correspondaient également aux sites de vaccinations. A la quatrième vaccination les lésions cibles progressaient et mesuraient respectivement 10 mm et 60 mm de diamètre. 5 nouvelles lésions cutanées étaient également constatées. Après la cinquième vaccination une progression majeure était mise en évidence avec la majoration en nombre et en taille des lésions cutanées, l'apparition de lésions secondaires ganglionnaires médiastinales et pelviennes et l'apparition de lésions secondaires osseuses notamment sur la sixième vertèbre cervicale. La sixième vaccination n'était pas réalisée et le protocole était interrompu de façon prématurée devant cette progression de la maladie.

La patiente 4 présentait lors de l'inclusion dans notre protocole 4 lésions secondaires cutanées et une lésion secondaire ganglionnaire inguinale gauche. La lésion cible 1 était un nodule de perméation à la face antérieure de la cuisse gauche mesurant 40 mm de diamètre. La lésion cible 2 était un nodule de perméation de la face antéro-interne de la jambe gauche mesurant 15 mm de diamètre (Figures 10 et 11). Ces 2 lésions cibles correspondaient également aux sites de vaccinations. Les lésions cibles grossissaient respectivement à la troisième vaccination (50 mm) et à la sixième vaccination (20 mm). A la neuvième vaccination les lésions cibles mesuraient respectivement 90 et 25 mm de diamètre. Compte tenu du bon état général de la patiente, de l'absence de nouvelle lésion et de la normalité des LDH, la maladie était considérée comme lentement progressive et le protocole était poursuivi. La lésion cible 1 devenant volumineuse et gênante était enlevée avant la dixième vaccination. La maladie était stable jusqu'à la douzième vaccination où la lésion cible 2 mesurait 30 mm de diamètre. Puis il était constaté une progression en taille et en nombre des lésions cutanées, une augmentation en taille de la lésion ganglionnaire inguinale et l'apparition de lésions secondaires osseuses sur la douzième vertèbre thoracique et la première vertèbre lombaire. La treizième vaccination n'était pas réalisée et le protocole était arrêté.

La patiente 5 présentait lors de l'inclusion dans notre protocole 3 lésions secondaires cutanées. La lésion cible 1 était localisée à la face antérieure de la jambe gauche et mesurait 25 mm de diamètre. La lésion cible 2 était située sur le bord externe de la cicatrice d'exérèse du mélanome de la jambe gauche et mesurait 20 mm de diamètre (Figures 12 et 13). Ces 2 lésions cibles correspondaient également aux sites de vaccinations. A la neuvième vaccination la patiente présentait une réponse partielle avec une diminution de plus de 30 % de la taille des lésions cibles et l'absence de nouvelle lésion. Les lésions cibles mesuraient respectivement 10 et 7 mm de diamètre. Le protocole était poursuivi mais lors de la treizième vaccination une majoration de la taille de l'ensemble des lésions était constatée. Les lésions cibles mesuraient respectivement 40 et 12mm. Aucune nouvelle lésion n'était constatée. Le protocole était arrêté avant la quatorzième vaccination.

		Taille (mm)				Evolution	Réponse
		V1	V3	V6	V9		
PATIENT 1	LC 1	7	7	7	8	Apparition de 2 nouveaux NP à V4 et V6	Progression
	LC 2	5	5	6,5	7		
PATIENT 2	LC 1	20	22	20	20	Disparition de 3 NP	Stabilité de la maladie
	LC 2	8	8	nd	8		
PATIENT 3	LC 1	7	9	> 10	nd	Apparition de nouvelles lésions Arrêt précoce du protocole	Progression
	LC 2	40	55	65	nd		
PATIENT 4	LC 1	40	50	50	90	Pas de nouvelle lésion Poursuite du protocole jusqu'à V12	Progression lente de la maladie
	LC 2	15	15	20	25		
PATIENT 5	LC 1	25	35	30	10	Pas de nouvelle lésion Poursuite du protocole jusqu'à V13	Réponse Partielle
	LC 2	20	20	5	7		

Tableau III : Réponse clinique des patients

LC : lésion cible
nd : donnée non disponible

V : vaccination
NP : nodule de perméation



Figure 7 : Réponse clinique du patient 1

1 : Lésion cible 1
A : Vaccination 1. Taille 7 mm
B : Vaccination 9. Taille 8 mm

2 : Lésion cible 2
A : Vaccination 1. Taille 5 mm
B : Vaccination 9. Taille 7 mm

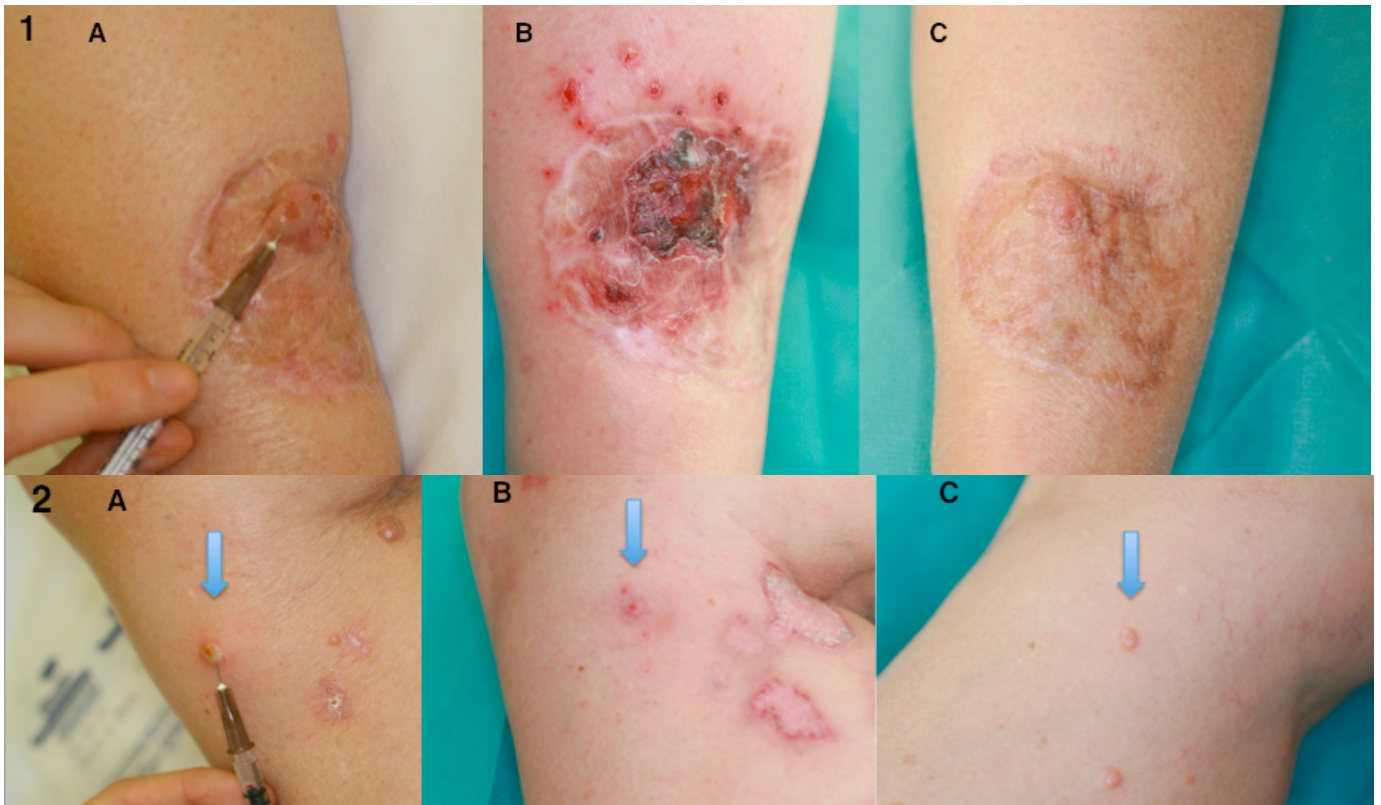


Figure 8 : Réponse clinique de la patiente 2

1 : Lésion cible 1
A : Vaccination 1. Taille 20mm
B : Vaccination 9. Taille 20mm
C : 3 mois après la fin du protocole. Taille 20mm

2 : Lésion cible 2
A : Vaccination 1. Taille 8 mm
B : Vaccination 9. Taille 8 mm
C : 3 mois après la fin du protocole. Taille 8 mm



Figure 9 : Réponse clinique du patient 3

1 : Lésion cible 1

A : 2 mois avant le protocole

B : Vaccination 1. Taille = 7 mm

C : Vaccination 3 Taille = 9 mm

2 : Lésion cible 2

A : 2 mois avant le protocole

B : Vaccination 1. Taille = 40 mm

C : Vaccination 3. Taille = 55 mm

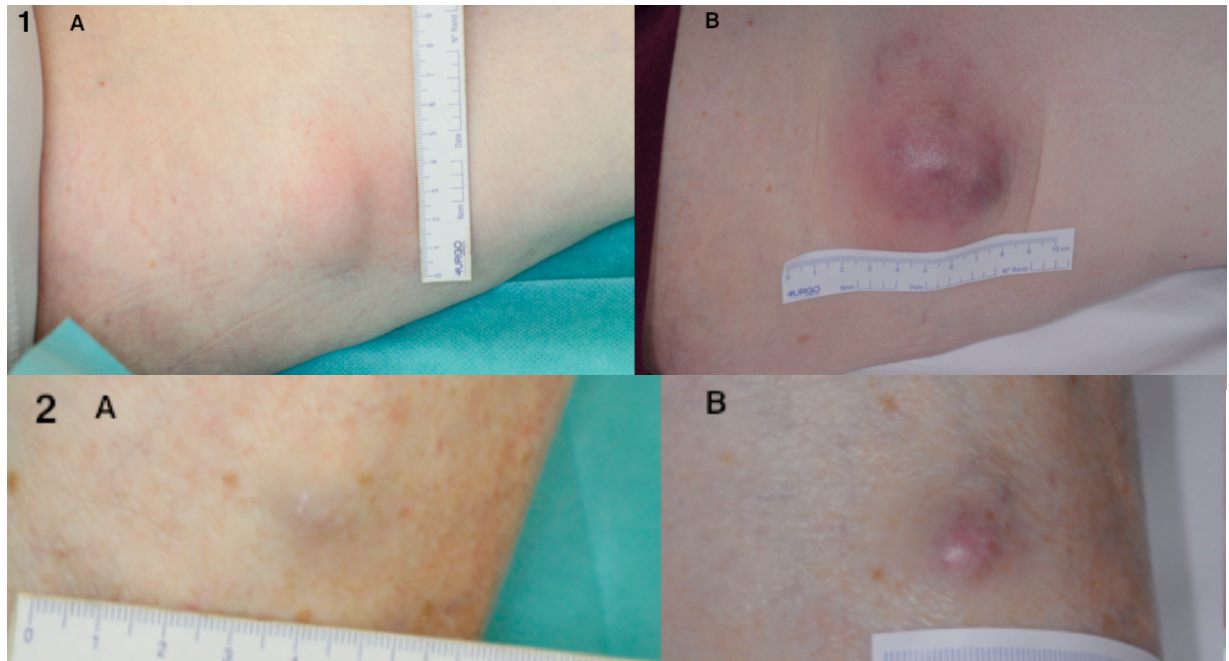


Figure 10 : Réponse clinique de la patiente 4

1 : Lésion cible 1

A : Vaccination 1. Taille 40 mm

B : Vaccination 9. Taille 90 mm

2 : Lésion cible 2

A : Vaccination 1. Taille 15 mm

B : Vaccination 9. Taille 25 mm

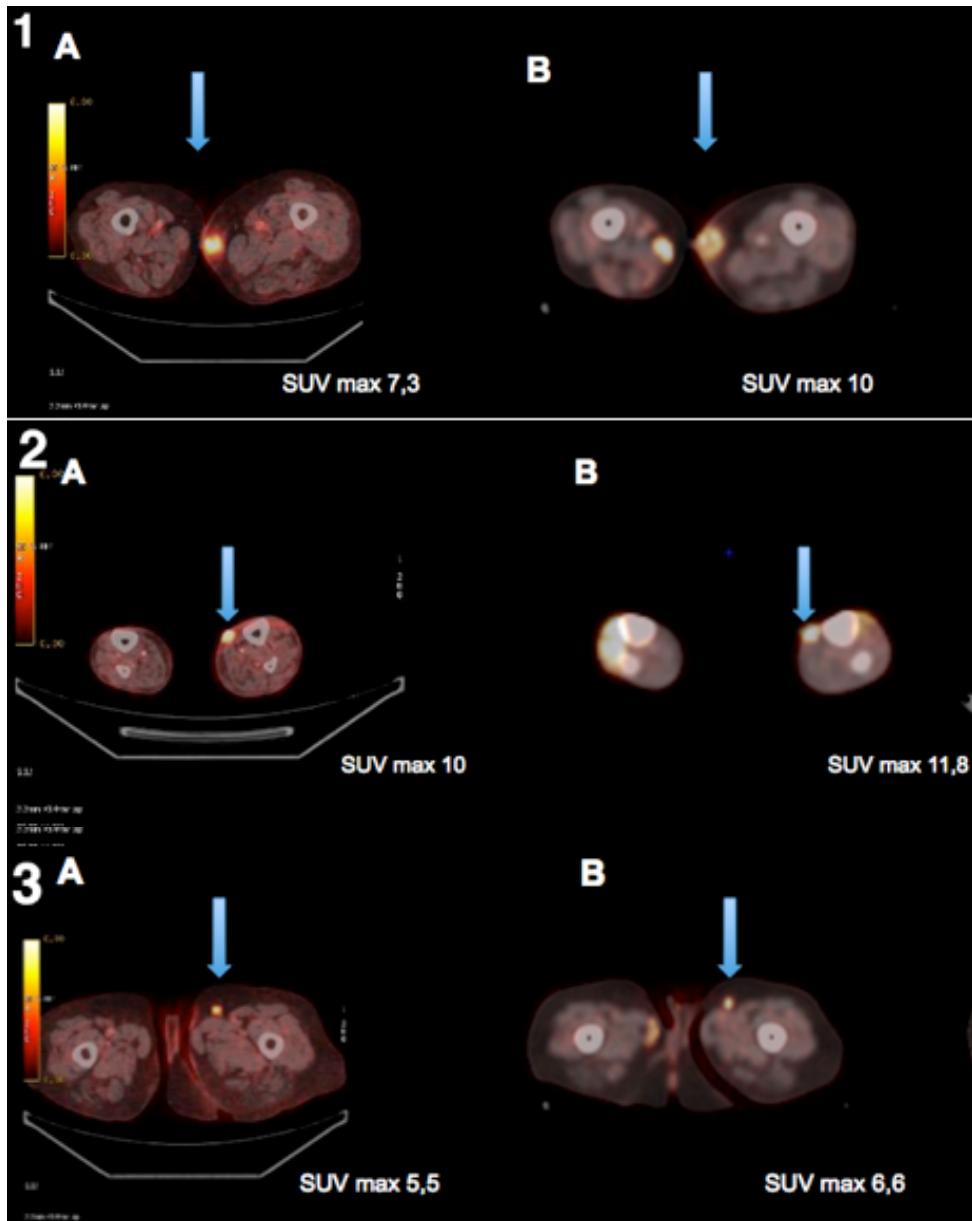


Figure 11 : Réponse au TEP-18FDG de la patiente 4

1 : Lésion cible 1

A : 2 mois avant le protocole. SUV max = 7,3

B : Vaccination 6. SUV max = 10

2 : Lésion cible 2

A : 2 mois avant le protocole. SUV max = 10

B : Vaccination 6. SUV max = 11,8

3 : Adénopathie inguinale gauche

A : 2 mois avant le protocole. SUV max = 5,5

B : Vaccination 6. SUV max = 6,6

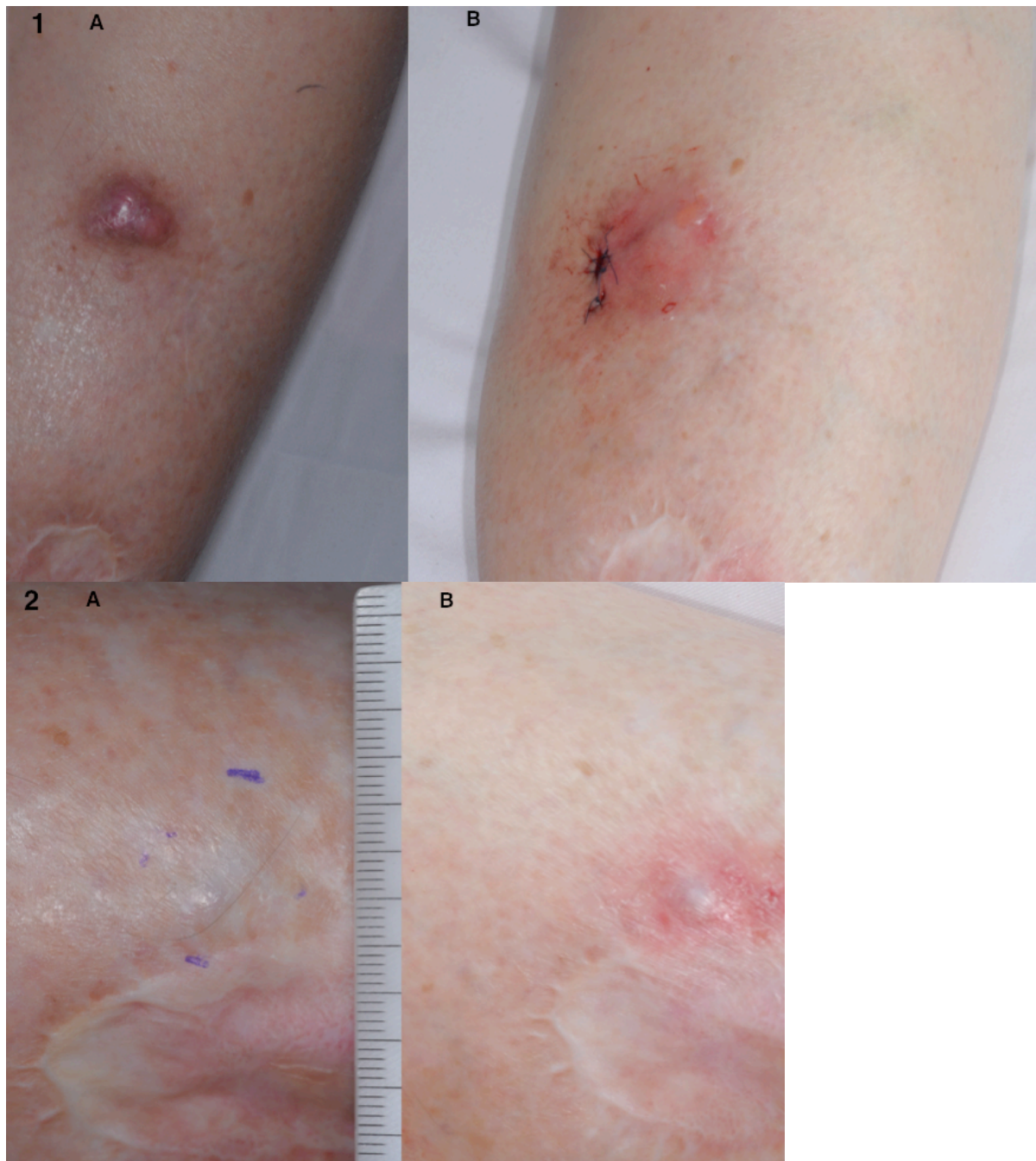


Figure 12 : Réponse clinique de la patiente 5

1 : Lésion cible 1
A : Vaccination 1. Taille 25 mm
B : Vaccination 9. Taille 10mm

2 : Lésion cible 2
A : Vaccination 1. Taille 20 mm
B : Vaccination 9. Taille 7 mm

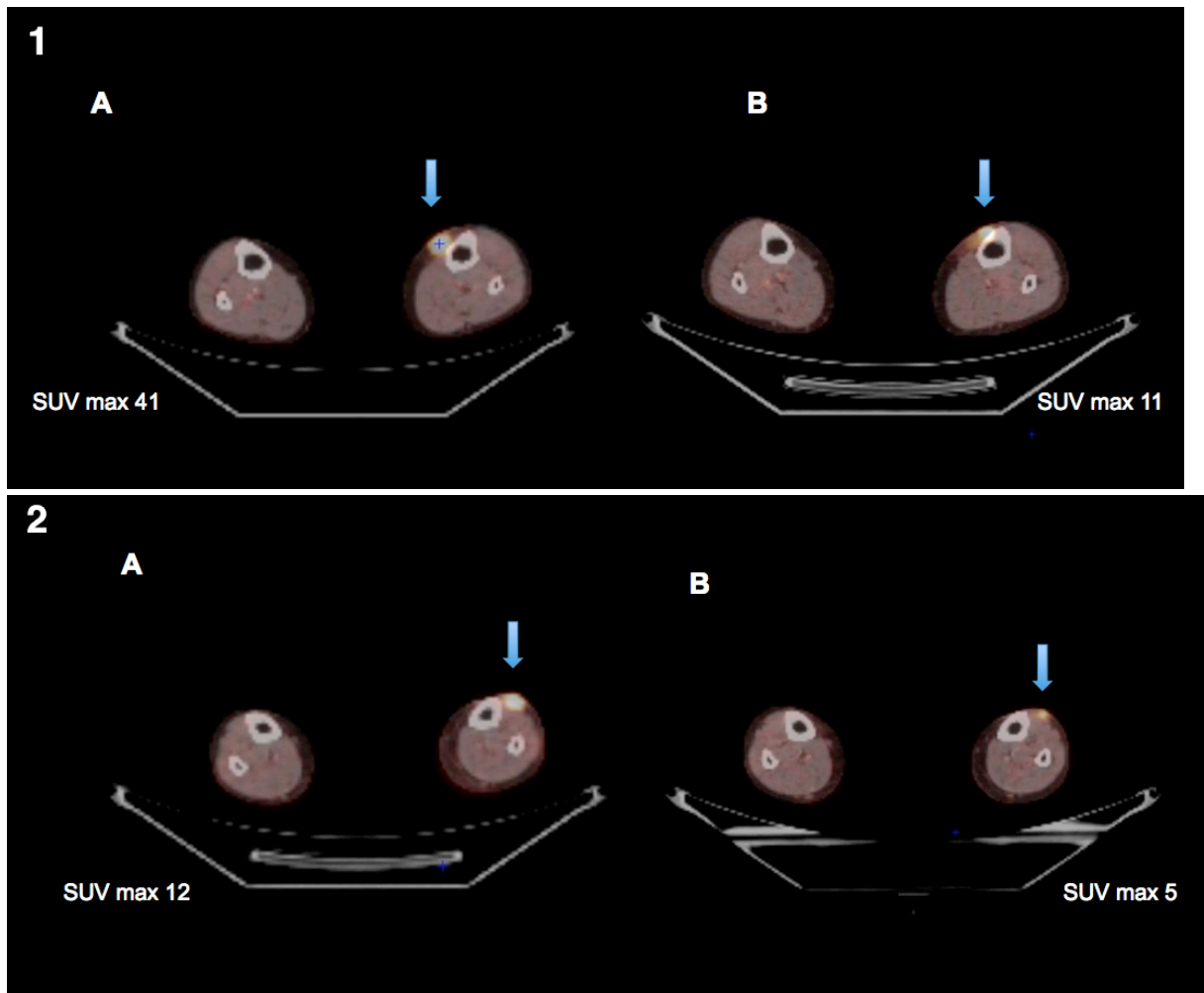


Figure 13 : Réponse au TEP-18FDG de la patiente 5

1 : Lésion cible 1

A : 2 mois avant le protocole. SUV max = 41

B : Vaccination 6. SUV max = 11

2 : Lésion cible 2

A : 2 mois avant le protocole. SUV max = 12

B : Vaccination 6. SUV max = 5

III. toxicité

Aucun événement indésirable sévère de grade 3 ou 4 n'était survenu lors du protocole. Aucun effet indésirable n'avait nécessité une diminution de la dose des traitements ou une interruption du protocole.

Le patient 1 ne présentait aucun effet indésirable.

Des réactions inflammatoires locales de grade 1 étaient constatées chez les patientes 4 et 5 en regard des sites d'injection et chez la patiente 2 en regard des sites d'application de l'imiquimod.

Des lymphopénies de grade 1 étaient constatées chez les patients 2, 3, 4 et 5. Chez les patientes 2, 4 et 5 les lymphopénies constatées étaient transitoires, spontanément réversibles et ne nécessitaient pas de traitement particulier. Chez le patient 3 la lymphopénie était constante pendant toute la durée du protocole mais légère et ne nécessitait pas de traitement.

IV. Survie

Seule la cinquième patiente était toujours en vie au dernier suivi carcinologique, 3 ans et 3 mois après l'inclusion dans le protocole.

La survie moyenne globale était de deux ans et cinq mois ou 29 mois. La survie moyenne sans progression était de 7,2 mois (Tableau IV).

	Décès	Survie globale	Survie sans progression
PAIENT 1	Oui	3 ans et 11 moi	3 mois
PATIENT 2	Oui	2 ans et 2 mois	9 mois
PATIENT 3	Oui	8 mois	2 mois
PATIENT 4	Oui	2 ans et 2 mois	4 mois
PATIENT 5	Non	3 ans et 3 mois	18 mois
Moyenne	/	2 ans et 5 mois	7,2 mois

Tableau IV : Survie globale et survie sans progression des patients

V. Analyse des LT régulateurs

Nous avons analysé la population de LT régulateurs dans le sang périphérique en fonction de la population des LT CD4 pour les 4 premiers patients (Figure 14). En raison de problèmes techniques cette analyse n'a pas pu être réalisée chez la cinquième patiente. Les LT régulateurs étaient caractérisés par le phénotype CD4+, CD25high, foxp3+, CD127-. Entre l'évaluation initiale et la première vaccination, à la semaine 4, les LT régulateurs n'avaient pas diminué ou avaient peu diminué (moins d'un facteur 2).

Chez les patients 1 et 3 on mettait en évidence une diminution des LT régulateurs lors des semaines de traitement par cyclophosphamide et une augmentation des LT régulateurs à la fin de chaque cycle.

Chez la patiente 4, les LT régulateurs étaient particulièrement bas. Ils augmentaient légèrement lors des vaccinations et diminuaient lors du traitement par cyclophosphamide.

Chez la patiente 2, le cyclophosphamide ne permettait qu'une diminution ponctuelle des LT régulateurs qui étaient globalement en augmentation.

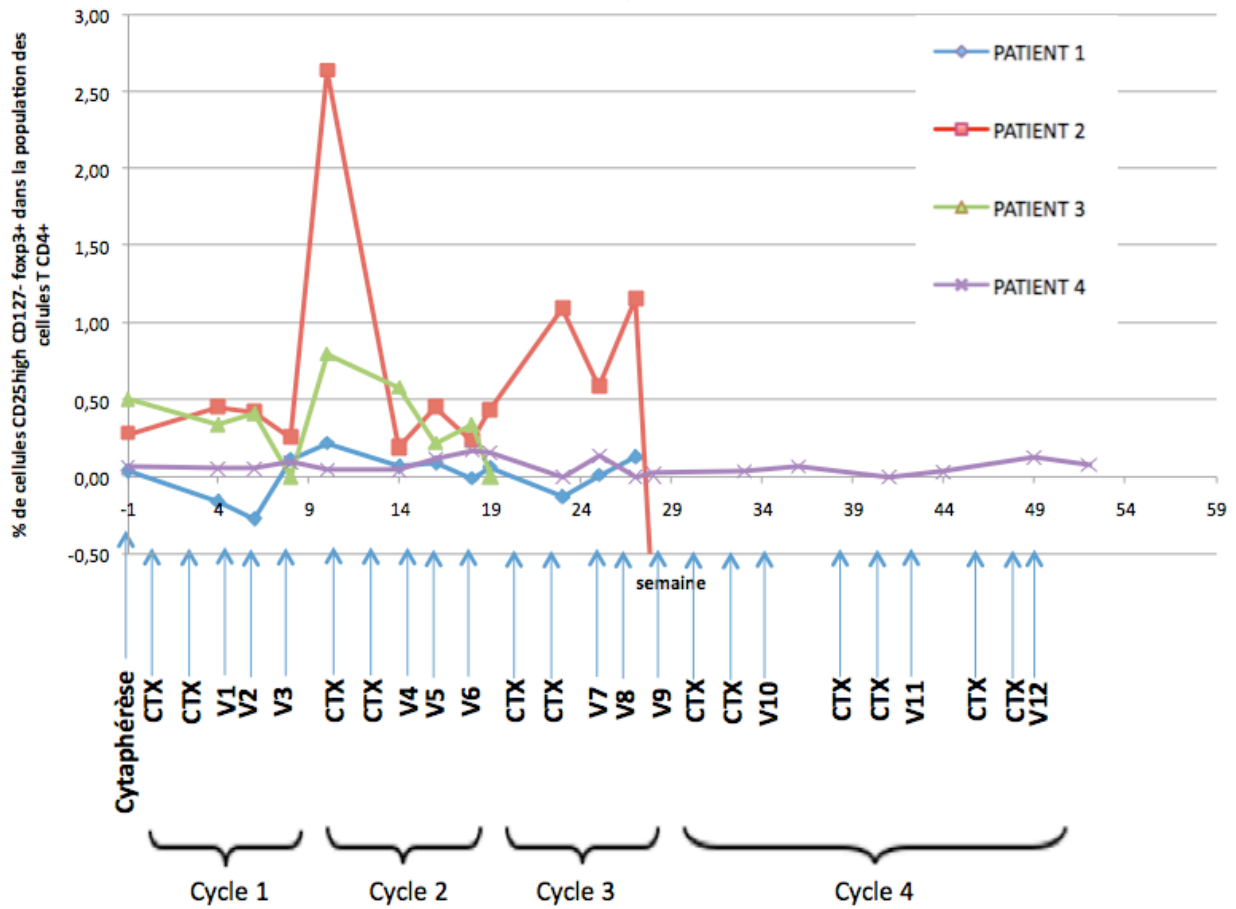


Figure 14 : Pourcentage de LT régulateurs dans la population des cellules T CD4+ dans le sang circulant des patients

VI. Analyse histologique

Nous avons comparé les prélèvements histologiques de lésions secondaires avant et pendant et/ou après le protocole de vaccination pour les patients 1, 2, 4 et 5 (Tableau V). Le patient 3 n'ayant pas bénéficié de prélèvement histologique après la réalisation du protocole, nous n'avons pu réaliser cette analyse comparative.

Pour les patientes 4 et 5, ayant respectivement présenté une progression lente de la maladie et une réponse partielle, une majoration de l'infiltrat lymphocytaire au sein et autour des métastases cutanées était observée pendant et après le protocole (Figures 17 et 18). En effet pour ces 2 patientes les prélèvements pré-protocole révélaient un infiltrat lymphocytaire faible. Les prélèvements per et post-protocole de lésions cibles et de lésions non cibles mettaient en évidence un infiltrat lymphocytaire modéré à intense composé de lymphocytes B et de LT majoritairement CD8. On notait au sein de la lésion cible 2 de la patiente 4, dont l'exérèse était réalisée 11 mois après la fin du protocole, un infiltrat lymphocytaire en trainée à distance de la lésion (Figure 17). Cet infiltrat était constitué de façon intense de lymphocytes B et de façon modérée de LT exclusivement CD8. De la même façon chez la patiente 5, on mettait en évidence au sein des deux lésions cibles enlevées 5 mois après la fin du protocole un infiltrat lymphocytaire en amas, à distance des lésions, constitué de façon intense de lymphocytes B et T CD8 (Figure 18). Par ailleurs on constatait au sein de la lésion cible 1 de la patiente 4, enlevée lors de la dixième vaccination du protocole, une nécrose importante et des polynucléaires altérés témoignant de l'inflammation au sein de cette lésion traitée par imiquimod et injection de CD (Figure 17).

Pour le patient 1, ayant progressé malgré le protocole de vaccination, une majoration de l'infiltrat lymphocytaire n'était constatée qu'au sein de la lésion cible 1, enlevée 1 mois après la fin du protocole (Figure 15). En effet, on mettait en évidence au sein de cette lésion un infiltrat lymphocytaire intense intra et péri-tumoral constitué majoritairement de LT correspondant pour 50 % à des LT CD8. Cependant lors de l'exérèse de la lésion cible 2 et d'autres lésions non cibles de la cuisse droite, 8 mois après la fin du protocole, il n'était pas constaté de majoration de l'infiltrat lymphocytaire qui restait faible en intra et péri-tumoral.

Pour la patiente 2, ayant présenté une réponse partielle, l'infiltrat lymphocytaire au sein de la lésion cible 2, enlevée 6 mois après la fin du protocole, était faible, de localisation péritumorale et composée préférentiellement de LT dont la moitié était des LT CD8 (Figure 16).

		PATIENT 1				PATIENT 2		PATIENT 4			PATIENT 5			
Délai du prélèvement	Avant protocole	Après protocole			Avant protocole	Après protocole	Avant protocole	Pendant protocole	Après protocole	Avant protocole	Après protocole			
		M+1	M+8								M+6	V10	M+11	M+5
Lésion	primitif	LC 1	LC2	autre	autre	LC2	autre	LC1	LC2	autre	LC1	LC2	autre	
Localisation	cuisse droite	cuisse droite	cuisse droite	cuisse droite	jambe droite	jambe droite	cheville gauche	cuisse gauche	jambe gauche	jambe gauche	jambe gauche	jambe gauche	jambe gauche	
Remarques	/	/	/	/	/	/	vasculite leucocytoclasique	nécrose PNN altérés		/	/	/	/	
Infiltrat lymphocytaire	Localisation	intraT périT	intraT périT	intraT périT	intraT périT	intraT périT	périT	intraT périT	périT	intraT périT à distance	intraT périT	intraT périT à distance	IntraT périT	
	Intensité	X	XXX	X	X	X	X	X	XX	XX	X	XXX	XX	
LB	Localisation	intraT périT	périT	intraT périT	périT	nd	périT	périT	périT	périT à distance	périT	périT intraT à distance	périT	
	Intensité	x	xx	x	x	nd	x	x	xx	xx	x	xxx	xx	
LT	Localisation	intraT périT	intraT périT	intraT périT	périT	nd	intraT périT	intraT périT	périT	intraT périT à distance	intraT	périT intraT à distance	intraT périT	
	Intensité	x	xxx	x	x	nd	x	x	x	xx	x	xx	xx	
LT CD8 / LT		60%	50%	80%	80%	nd	50%	100%	60%	100%	100%	100%	75%	

Tableau V : Comparaison de l'infiltrat lymphocytaire au sein des lésions secondaires cutanées avant pendant et après le protocole de vaccination pour les cas 1, 2, 4 et 5

X : faible ; XX : modéré ; XXX : intense
 LT : lymphocytes T ; LB : lymphocytes B ; PNN : polynucléaires neutrophiles
 IntraT : intratumoral ; périT : péri-tumoral
 M : mois ; V : vaccination

LC1 : lésion cible 1 ; LC2 : lésion cible 2
 nd : donnée non disponible
 / : aucun

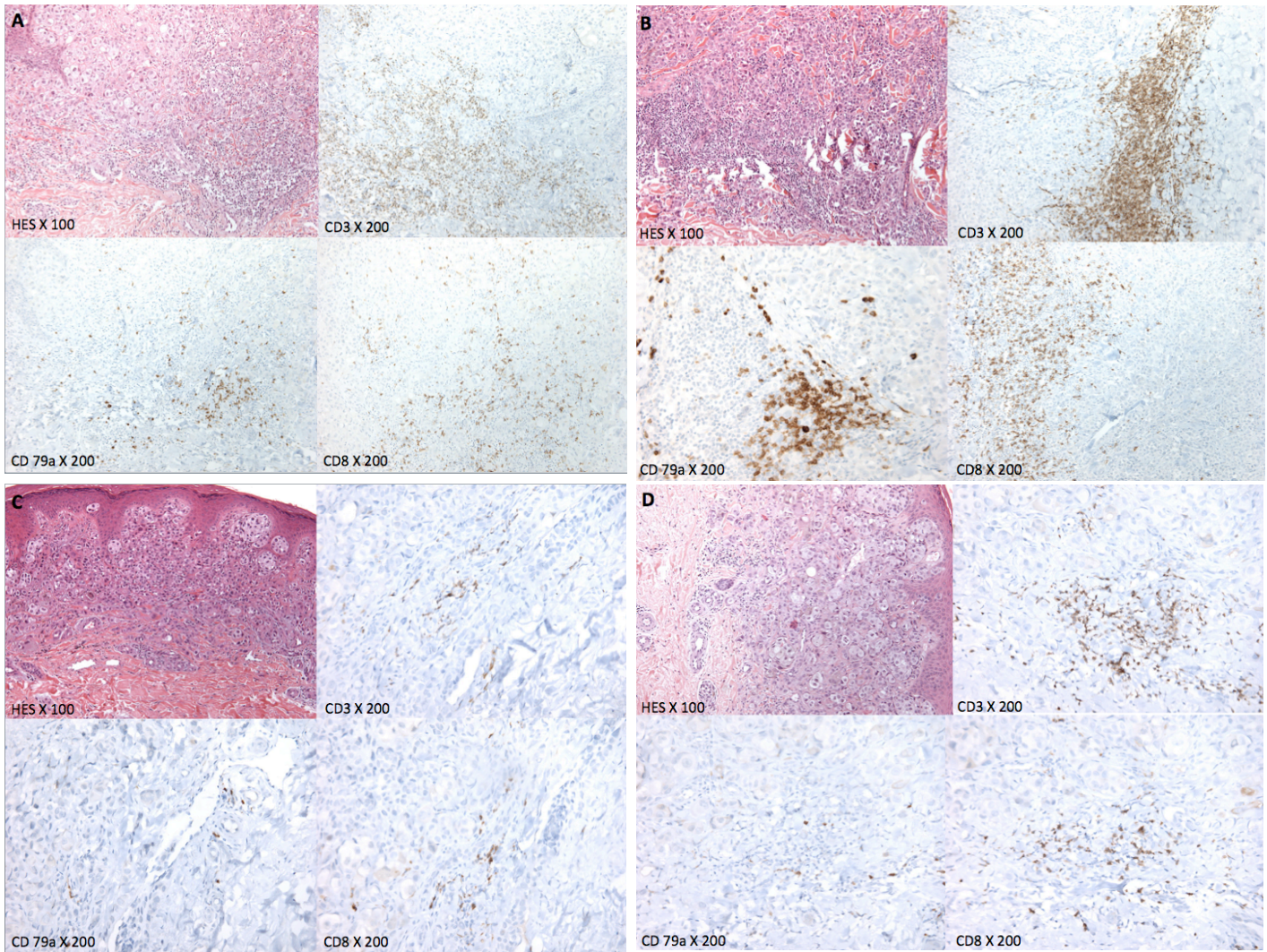


Figure 15 : Histologie de lésions cutanées du cas 1

- A : Avant le protocole. Mélanome primitif
B : Après le protocole. Lésion cible 1, un mois après la fin du protocole
C : Après le protocole. Lésion cible 2, huit mois après la fin du protocole
D : Après le protocole. Lésion non cible, huit mois après la fin du protocole

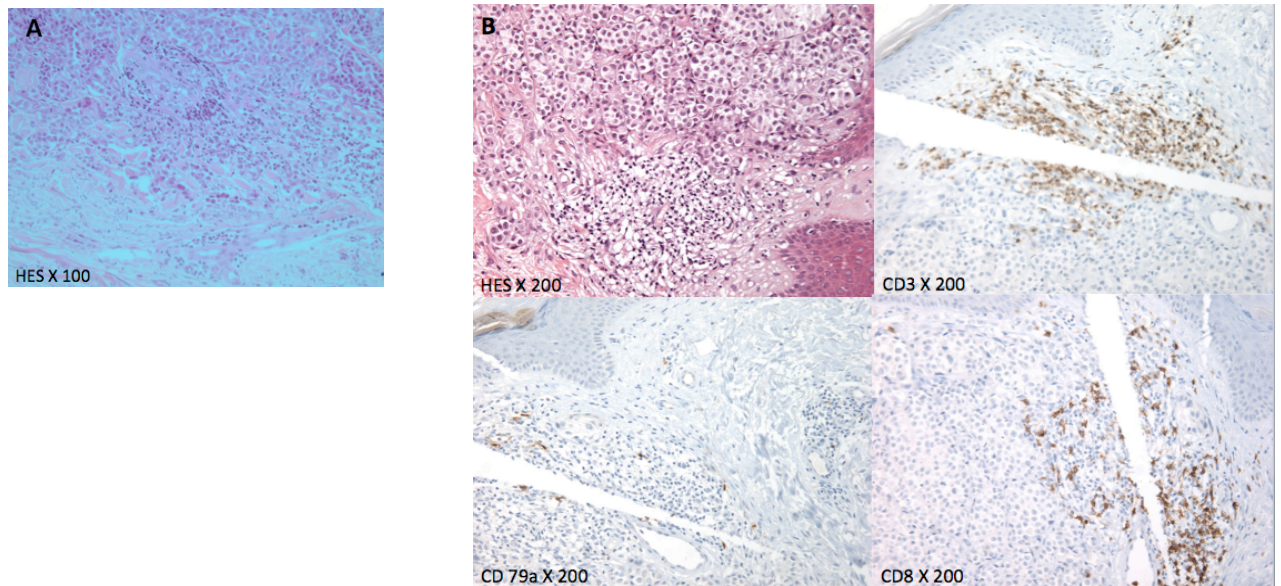


Figure 16 : Histologie de lésions cutanées du cas 2

A : Avant le protocole. Métastase cutanée
B : Après le protocole. Lésion cible 2, six mois après la fin du protocole

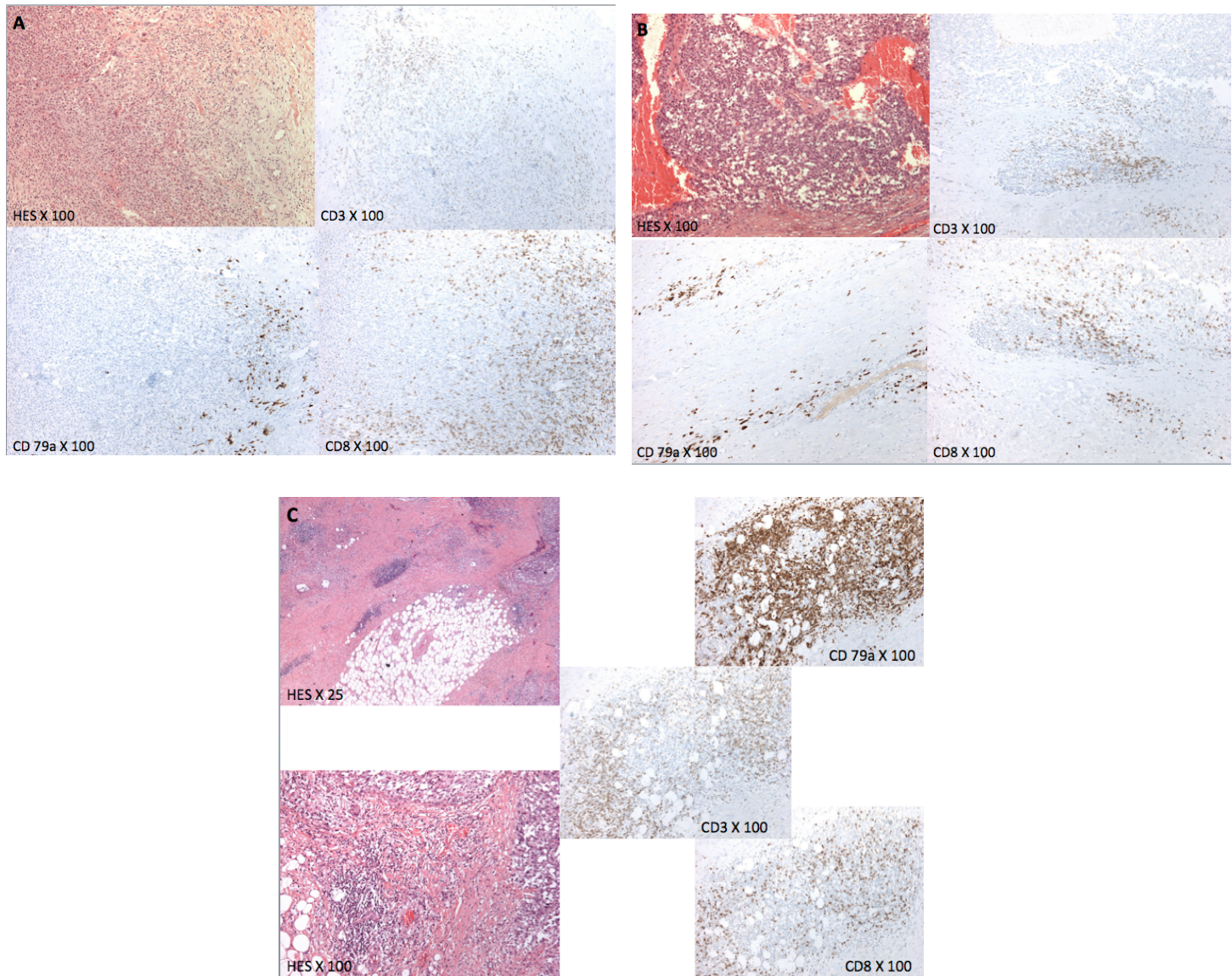


Figure 17 : Histologie de lésions cutanées du cas 4

A : Avant le protocole. Métastase cutanée

B : Pendant le protocole. Lésion cible 1, lors de la dixième vaccination

C : Après le protocole. Lésion cible 2, onze mois après la fin du protocole

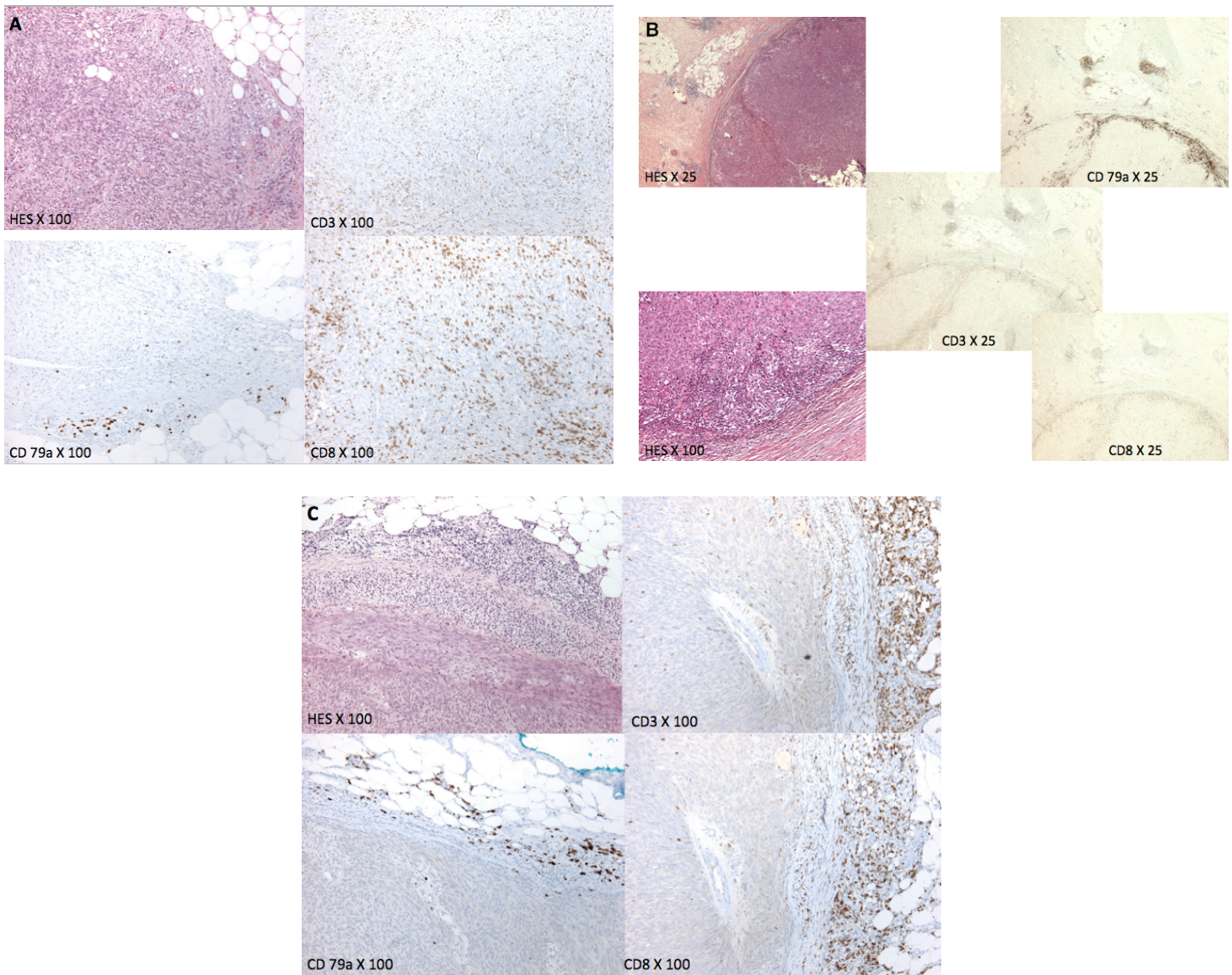


Figure 18 : Histologie de lésions cutanées du cas 5

A : Avant le protocole. Métastase cutanée
 B : Après le protocole. Lésion cible 1 et 2, cinq mois après la fin du protocole
 C : Après la fin du protocole. Lésion non cible, douze mois après la fin du protocole

VII. Analyse des paramètres biologiques

Aucune corrélation n'était mise en évidence entre la réponse clinique et le taux de LDH, le taux de CRP, le taux de lymphocytes, le taux de polynucléaires éosinophiles ni entre le rapport des polynucléaires neutrophiles sur les lymphocytes (Figure 19).

En effet les dosages de tous de ces paramètres étaient normaux.

Les valeurs de base de ces paramètres et leurs variations au cours du temps n'étaient pas différentes chez les patients en réponse ou en progression.

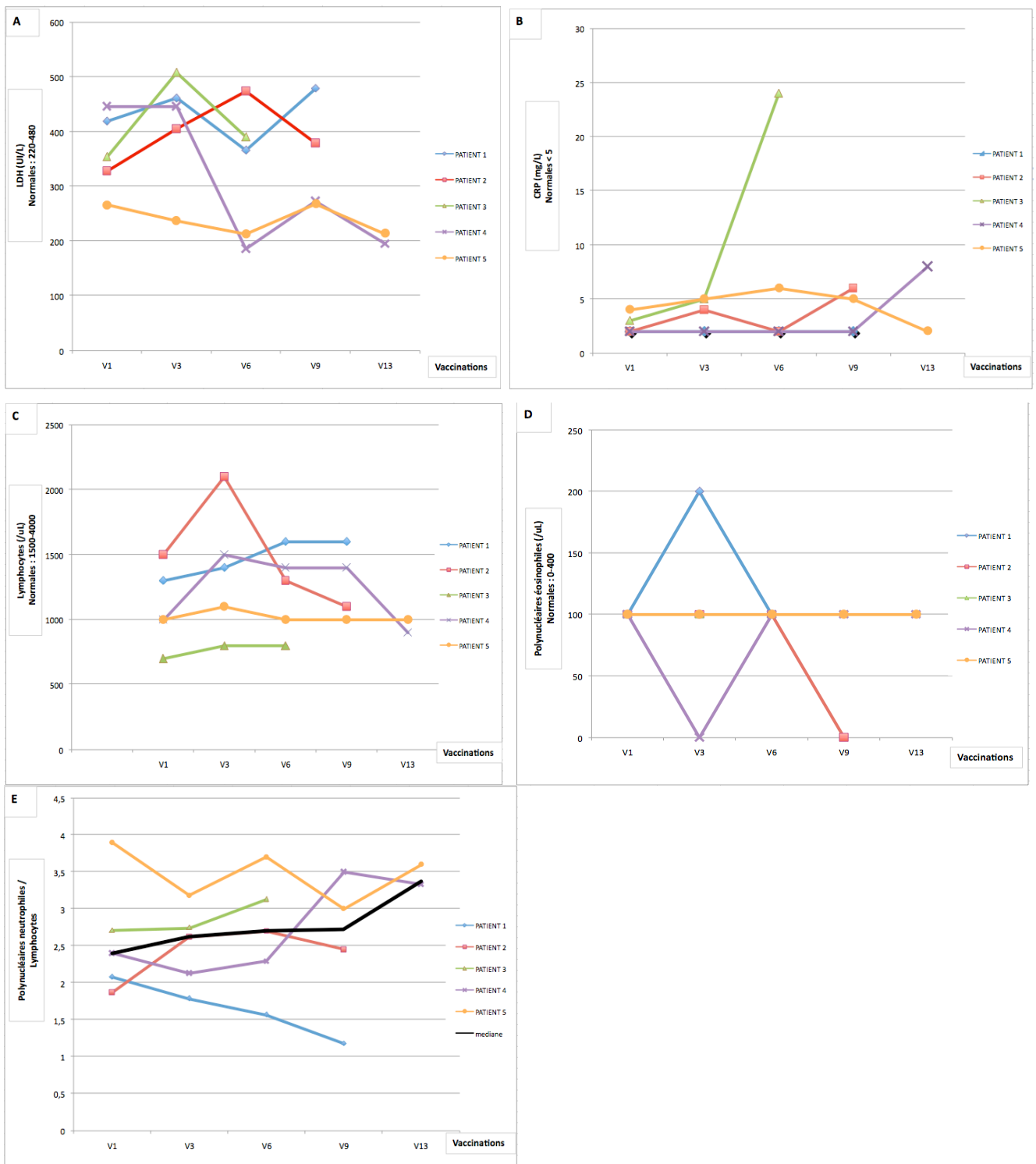


Figure 19 : Evolution des paramètres biologiques en fonction du temps

- A : LDH
- B : CRP
- C : Lymphocytes
- D : Polynucléaires éosinophiles
- E : Polynucléaires neutrophiles / Lymphocytes

DISCUSSION

I. Apports et limites de notre travail

Au total, nous mettons en évidence dans ce travail un contrôle de la maladie pour 3 patients sur 5 lors de la vaccination par CD autologues de type CD-I3 en injection intra-tumorale au sein de métastases cutanées préalablement traitées par de l'imiquimod topique et en association à un traitement par cyclophosphamide. En effet nous avons mis en évidence une réponse partielle (patiente 5), une stabilité de la maladie (patiente 2) et une maladie lentement évolutive (patiente 4). Deux patients progressaient (patients 1 et 3). La patiente 5, ayant présenté une réponse partielle, avait bénéficié avant la réalisation du protocole de vaccination d'un traitement par IFN- α pendant une durée de deux ans et un mois puis d'un traitement par imiquimod topique et 5-FU topique sur les métastases cutanées pendant une durée de un an. Ces traitements préalables, ayant stimulé le système immunitaire de la patiente avant la vaccination, ont probablement favorisé la réponse immune antitumorale et amélioré la réponse clinique.

La survie moyenne globale était de 2 ans et 5 mois soit 29 mois et la survie moyenne sans progression était de 7,2 mois. L'évaluation de la survie et plus particulièrement de la survie globale semble être le critère le plus pertinent pour mesurer le bénéfice des immunothérapies (67)(111). En effet les immunothérapies et plus particulièrement les vaccinations par CD peuvent augmenter la survie globale sans modifier la progression tumorale initiale. Une réponse retardée est généralement observée avec un ralentissement de la croissance tumorale retardé et un allongement de la survie globale (67,112). L'évaluation de la survie dans notre protocole est biaisée par l'ensemble des traitements dont les patients ont bénéficié avant et après notre protocole de vaccination.

La survie moyenne sans progression était de 7,2 mois. Chez les patients dont la maladie était contrôlée par le protocole de vaccination, elle était augmentée à 18

mois pour la patiente 5 ayant présenté une réponse partielle et à 9 mois pour la patiente 2 ayant présenté une stabilité de la maladie.

Dans la littérature, la survie sans progression était évaluée à 2,8 mois chez des patients traités par anti-CTLA-4 (ipilimumab), à 5,5 mois chez des patients traités par anti-PD-1 (pembrolizumab) (8,12), à 7,3 mois chez des patients traités par anti-RAF seul et entre 9,3 et 11,4 mois selon les études chez les patients traités par association anti-RAF et anti-MEK (3,4,6)(5). La survie globale était évaluée entre 10 et 11 mois pour les patients traités par ipilimumab (7,8), entre 13 et 17 mois pour les patients traités par anti-RAF (2,4) et à 16,8 mois pour les patients traités par nivolumab (13). Les résultats de survie globale ne sont pas encore disponibles pour l'association anti-RAF et anti-MEK.

Dans ce travail les patients ont reçu après le protocole de vaccination plusieurs traitements antitumoraux, notamment de l'ipilimumab pour 2 patients et des chimiothérapies pour 4 patients. L'appréciation de la survie globale dans notre travail est donc plutôt représentative de la prise en charge globale des patients que de la prise en charge exclusive par le protocole de vaccination.

Les effets indésirables constatés lors du protocole étaient des réactions inflammatoires de grade 1 aux sites d'injection ou d'application de l'imiquimod et une lymphopénie de grade 1. L'innocuité de la vaccination par CD était donc confirmée dans notre travail.

Une limite majeure de notre travail est son manque de puissance compte tenu du faible effectif de 5 patients. Dans la littérature, plusieurs équipes se sont intéressées à la vaccination par CD et de très nombreux protocoles ont été proposés. Cependant il s'agit majoritairement d'études réalisées sur de faibles effectifs de patients atteints de mélanome métastatique. On assiste en effet à une absence de standardisation des essais cliniques et à un manque d'évaluation à grande échelle de la vaccination par CD dans le mélanome métastatique.

Notre travail avait comme objectif d'améliorer la réponse immune antitumorale en inhibant la population de LT régulateurs grâce au cyclophosphamide. Nous avons mis en évidence une décroissance des LT régulateurs lors du traitement par cyclophosphamide chez les patients 1 et 3. De façon paradoxale, ces patients

présentaient une progression de la maladie. Chez la patiente 4 présentant une maladie lentement évolutive, les LT régulateurs étaient particulièrement bas tout au long du protocole, permettant ainsi une meilleure action du système immunitaire et un meilleur contrôle de la maladie. Dans notre travail, l'inhibition des LT régulateurs par le cyclophosphamide n'était pas corrélée à une meilleure réponse clinique.

Dans la littérature plusieurs stratégies d'association sont proposées pour inhiber les LT régulateurs. Il a été proposé d'associer la vaccination par CD au dasatinib, un inhibiteur de la kinase BCR-ABL, utilisé dans le traitement des leucémies. Une étude réalisée chez les souris mettait en évidence avec cette association une diminution de la croissance tumorale, une augmentation de la survie globale, une diminution des LT régulateurs et des myeloid derived suppressor cells (MDSC) et une augmentation des LT cytotoxiques (113). D'autres auteurs ont proposé d'associer la vaccination par CD à un anticorps monoclonal anti-CD25, le daclizumab ou le basiliximab. Cette molécule inhibe la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 à la surface des LT régulateurs. Les essais réalisés mettaient en évidence une diminution transitoire des LT régulateurs et une inhibition des fonctions effectrices des LT régulateurs. Cependant il n'était pas observé d'amélioration de la survie globale ni de diminution de la progression tumorale. De plus, une diminution des LT cytotoxiques était parfois associée (114,115). L'association de la vaccination par CD au denileukin diftotox, une protéine de fusion entre l'IL-2 et la toxine diphtérique a également été proposée avec des résultats divergents. Dans une étude réalisée chez des patients atteints de cancer du rein, les LT cytotoxiques étaient retrouvés en quantité seize fois plus importante avec cette association (116). Cependant d'autres études suggéraient un effet néfaste de cette association sur la capacité des CD à induire des LT spécifiques et sur les NK (67). Une autre stratégie pour diminuer les LT régulateurs serait de charger les CD avec l'antigène foxp3 afin que les CD elles-mêmes s'attaquent aux LT régulateurs. Une étude réalisée chez les souris mettait en évidence une réduction de 85 % des LT régulateurs sur le site tumoral et une diminution de la croissance tumorale (115).

D'un point de vue histologique, nous avons mis en évidence une augmentation de l'infiltrat lymphocytaire intra et péri-tumoral après la réalisation du protocole de vaccination chez les patientes 5 et 4 ayant présenté respectivement une réponse partielle et une maladie lentement progressive. Il était également associé chez ces

patientes un infiltrat lymphocytaire en amas ou en trainée à distance des tumeurs pouvant correspondre à des lymphocytes en cours de migration. Nous constatons chez ces patientes une persistance d'un l'infiltrat lymphocytaire modérée de façon durable, jusqu'à 12 mois après la fin du protocole. Cette infiltration lymphocytaire forte ou modérée était présente dans les lésions traitées par imiquimod et injection de CD mais également dans des lésions à distance non traitées. Les résultats histologiques sont donc corrélés aux résultats cliniques avec une augmentation de l'infiltrat lymphocytaire au sein des lésions secondaires cutanées chez les patientes dont la maladie était contrôlée.

Il aurait également été intéressant d'analyser l'infiltrat de CD au sein des tumeurs. Dans la littérature les CD peuvent être identifiées grâce à l'association de différents immunomarquages. Les cellules de langerhans sont identifiées par un marquage PS100+, CD1a+ et langerine+. Les CD interstitielles, situées dans le derme, sont identifiées par un marquage PS100-, CD1a-, langerine- et CD68+ (117). Les CD dermiques peuvent également être marquées par le CD36 (118).

L'étude de l'infiltration des NK pourrait également être intéressante puisque les NK jouent un rôle clé dans la réponse immune innée et adaptative induite par les CD. En effet les NK sont activés par les CD et certaines études rapportent une diminution de la réponse immune lors de la déplétion en NK (67,119–122).

Plusieurs études proposent également d'évaluer la qualité de la réponse immune en réalisant des tests cutanés d'hypersensibilité retardée. Après le cycle de vaccination une injection intradermique de CD chargées en antigènes tumoraux était réalisée dans le dos des patients. Si une réaction cutanée était mise en évidence à 48 heures, une biopsie cutanée était réalisée afin d'évaluer l'infiltration par les LT CD8 spécifiques. La réponse immune spécifique mise en évidence en histologie semblait être corrélée à la réponse clinique. Dans une étude portant sur 26 patients présentant un mélanome métastatique, 13 des 15 patients en progression, ne présentaient pas de réponse immune spécifique en histologie. Chez 6 des 10 patients stables, une réponse immune spécifique était mise en évidence (123,124).

II. Vaccination par cellules dendritiques dans d'autres tumeurs

La vaccination par CD est proposée dans d'autres tumeurs et notamment dans le cancer de la prostate, le cancer rénal et les gliomes malins. Dans le cancer de la prostate métastatique résistant à la castration, une immunothérapie active, le sipuleucel-T, a été développée et approuvée par l' United States Food and Drug Administration en 2011. Le sipuleucel-T est une vaccination à base de cellules présentatrices d'antigènes obtenues à partir des cellules mononuclées du sang périphérique par cytophérèse. Ces cellules présentatrices d'antigènes sont activées ex vivo par la mise en culture avec une protéine recombinante de fusion (PA2024) associant un antigène tumoral prostatique, l'acide phosphatase prostatique et du GM-CSF. Le traitement est administré par voie intraveineuse en trois injections réalisées toutes les deux semaines. Ce traitement a été évalué dans l'étude IMPACT, un essai de phase III randomisé contrôlé réalisé chez 512 patients. Il était mis en évidence une augmentation de la survie globale à 25,4 mois avec ce traitement contre 21,7 mois avec un traitement placebo. Une réponse immune spécifique forte était également mise en évidence mais le taux de réponse clinique objective était inférieur à 5 % (125,126).

III. Place de la vaccination par cellules dendritiques en association dans le mélanome

Compte tenu du développement récent de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces ayant reçu l'AMM dans la prise en charge du mélanome métastatique, il nous semble pertinent d'envisager la vaccination par CD en association à ces traitements.

A. Association aux anti-RAF et anti-MEK

Plusieurs études précliniques et cliniques suggèrent que l'inhibition de la voie MAP Kinase peut avoir un effet favorable sur la réponse immune spécifique dans le mélanome métastatique (127).

Une étude s'intéressant à la contribution du système immunitaire de l'hôte dans l'activité antitumorale des traitements anti-RAF suggérait que ces traitements étaient associés à une diminution des LT régulateurs au sein de la tumeur. Selon cette étude, réalisée chez des souris, les anti-RAF diminuaient la production tumorale de la chimiokine CCL2. Son récepteur, le CCR2, étant exprimé préférentiellement par les LT régulateurs, ces derniers se retrouvaient moins attirés par la tumeur. Au total, avec un traitement anti-RAF, on observait une quantité plus importante de LT CD8 par rapport aux LT régulateurs au sein de la tumeur. Une augmentation des NK au sein de la tumeur était également notée (128).

Des résultats similaires ont été décrits chez l'homme avec l'observation d'une augmentation de l'infiltration des LT CD4 et CD8 au sein de la tumeur après un traitement anti-RAF seul ou associé à un anti-MEK. De plus on observait une augmentation de l'expression des antigènes tumoraux au sein de la tumeur (127,129,130).

L'activation constitutive de la voie MAP Kinase, chez les patients présentant un mélanome avec mutation du gène BRAF, induit une sécrétion de cytokines immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral affectant la fonctionnalité des LT et des CD. In vitro, l'ajout d'anti-RAF ou d'anti-MEK, permettait de supprimer

cette sécrétion de cytokines, d'améliorer l'exposition des antigènes tumoraux, de restaurer la fonctionnalité des CD et ainsi d'améliorer la présentation des antigènes tumoraux aux LT (127,131,132).

En revanche les anti-MEK pourraient avoir des effets négatifs sur la fonctionnalité et la viabilité des CD et des lymphocytes in vitro mais ces données doivent encore être précisées in vivo (131,133).

Compte tenu de ces effets sur le système immunitaire, l'association des anti-RAF aux immunothérapies et plus particulièrement à la vaccination par CD pourrait être envisagée. Actuellement il n'existe dans la littérature aucune étude évaluant l'association de la vaccination par CD aux traitements anti-RAF ou anti-MEK.

B. Association aux anti-CTLA-4

Il a également été proposé d'associer la vaccination par CD aux anticorps anti-CTLA-4. Une étude réalisée chez des souris présentant un lymphome mettait en évidence une diminution de la croissance tumorale chez plus de 60 % des souris avec cette association. La vaccination par CD était couplée à deux injections d'anti-CTLA-4 réalisées à deux jours d'intervalle. 17 jours après le traitement, 5 souris sur 11 présentaient une régression complète des lésions et 2 une maladie lentement évolutive. Des LT cytotoxiques spécifiques étaient mis en évidence chez toutes les souris en réponse complète (134).

Cette association a également été proposée dans un essai de phase I chez 16 patients atteints de mélanome métastatique. Trois vaccinations par CD étaient réalisées toutes les deux semaines associées à un traitement par tremelimumab à la dose de 3, 6, 10 et 15 mg/kg/mois. Deux patients présentaient une réponse complète, deux une réponse partielle et un une stabilité de la maladie. Ces patients présentaient une survie sans progression comprise entre 2 et 4 ans. Une réponse immune des LT CD8 était mise en évidence de façon identique pour les patients répondeurs et non répondeurs. Les effets indésirables notés étaient une diarrhée de grade 3 et une hypophysite de grade 2 (135).

Une étude évaluant l'impact de la réalisation de vaccinations par CD avant un traitement par ipilimumab mettait en évidence une diminution des LDH et un meilleur contrôle de la maladie chez les patients ayant bénéficié d'une vaccination par CD. Le

taux de réponse partielle était de 20 % chez les patients vaccinés contre 17 % chez les patients non vaccinés (136).

L'association de la vaccination par CD à l'ipilimumab semble intéressante au vu de ces résultats. Cependant la majoration des effets indésirables présentés avec l'ipilimumab est à craindre.

C. Association aux chimiothérapies

Un effet synergique est rapporté lors de l'association de chimiothérapies aux immunothérapies (137–139). La chimiothérapie, en permettant une diminution de la masse tumorale, peut diminuer l'immunosuppression induite par la tumeur et augmenter la susceptibilité immunologique des cellules tumorales (67).

D. Association à la radiothérapie

Par ailleurs l'efficacité de la vaccination par CD peut être augmentée par son association à la radiothérapie.

Plusieurs études chez les souris mettaient en évidence une augmentation de la survie, une diminution de la progression tumorale, une diminution des récidives et des lésions à distance grâce à cette association (140,141). En effet Teitz-Tennenbaum et al. rapportaient une survie globale de 10 % à 40 jours avec l'association des deux traitements contre 10 % à 10 jours avec la vaccination seule. Dans cette étude, la survie sans métastases était de 50 % à 35 jours avec l'association et de 50 % à 15 jours avec la vaccination seule (142). Seagal Teitz-Tennenbaum et al. mettaient en évidence un ralentissement de la progression tumorale avec une tumeur mesurant 150 mm² à 20 jours avec l'association contre 275 mm² à 20 jours avec la vaccination seule (143).

Les études sur les souris mettaient également en évidence une amélioration de la réponse immune avec une augmentation de la phagocytose, du nombre de LT cytotoxiques, de la maturation et de la migration des CD. De plus les antigènes tumoraux étaient démasqués par des phénomènes d'apoptose et de nécrose (141,144).

Une étude clinique suggérait qu'un traitement antérieur par radiothérapie était un facteur prédictif d'efficacité de la vaccination par CD (145,146).

La radiothérapie est en effet connue pour améliorer l'efficacité des immunothérapies comme l'IL-2 et l'ipilimumab. La radiothérapie permet d'améliorer la présentation des antigènes tumoraux et d'améliorer la qualité de la réponse immune antitumorale en jouant sur l'efficacité des NK, l'infiltration des CD8, l'activation des CD4 (146). L'abscopal effect observé avec l'ipilimumab en est un exemple intéressant. La radiothérapie locale permet d'obtenir une régression tumorale à distance du site tumoral irradié grâce à l'induction d'une réponse immune antitumorale (147).

CONCLUSION

Les résultats de notre travail évaluant la vaccination par CD autologues de type CD-13 en injection intra-tumorale au sein de métastases cutanées préalablement traitées par de l'imiquimod topique et en association à un traitement par cyclophosphamide sont encourageants, avec une survie sans progression satisfaisante et un contrôle de la maladie chez plusieurs patients.

De plus une corrélation entre les résultats cliniques et histologiques était mise en évidence. En effet chez les patients dont la maladie était contrôlée, il existait une majoration de l'infiltrat lymphocytaire au sein des métastases cutanées.

L'innocuité de cette immunothérapie est confirmée dans ce travail.

La place de la vaccination par CD dans la prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique reste à définir. Ce traitement pourrait être envisagé en association aux thérapies ciblées, aux immunothérapies voire à la radiothérapie.

Une harmonisation des protocoles de vaccination par CD semble nécessaire afin d'envisager une évaluation de ce traitement à plus grande échelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med.* 2 sept 2004;351(10):998-1012.
2. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 30 juin 2011;364(26):2507-16.
3. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 13 nov 2014;371(20):1867-76.
4. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med.* 1 janv 2015;372(1):30-9.
5. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Larkin J, Liskay G, Maio M, et al. coBRIM: a phase 3, double-blind, placebo-controlled study of vemurafenib versus vemurafenib + cobimetinib in previously untreated BRAF (V600) mutation-positive patients with unresectable locally advanced or metastatic melanoma (NCT01689519). *J Transl Med.* 2015;13:2061.
6. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med.* 13 nov 2014;371(20):1877-88.
7. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 30 juin 2011;364(26):2517-26.
8. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 19 août 2010;363(8):711-23.
9. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* avr 2015;16(4):375-84.
10. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 21 mai 2015;372(21):2006-17.

11. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 22 janv 2015;372(4):320-30.
12. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 19 avr 2015;
13. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 avr 2014;32(10):1020-30.
14. Schallreuter KU, Levenig C, Berger J. Vitiligo and cutaneous melanoma. A case study. *Dermatologica*. 1991;183(4):239-45.
15. Boasberg PD, Hoon DSB, Piro LD, Martin MA, Fujimoto A, Kristedja TS, et al. Enhanced survival associated with vitiligo expression during maintenance biotherapy for metastatic melanoma. *J Invest Dermatol*. déc 2006;126(12):2658-63.
16. Routier É, Robert C, Mateus C. [Immunotherapies and melanoma]. *Bull Cancer (Paris)*. déc 2014;101 Suppl 2:S13-24.
17. Ghiringhelli F, Zitvogel L. [Vaccine strategies against melanoma]. *Médecine Sci MS*. févr 2006;22(2):183-7.
18. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 20 déc 1989;81(24):1893-904.
19. Wimmers F, Schreibelt G, Sköld AE, Figdor CG, De Vries IJM. Paradigm Shift in Dendritic Cell-Based Immunotherapy: From in vitro Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets. *Front Immunol*. 2014;5:165.
20. Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N. [Antitumor immunity and cellular cancer therapies]. *Médecine Sci MS*. janv 2003;19(1):43-53.
21. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 13 déc 1991;254(5038):1643-7.
22. Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, et al. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med*. 1 nov 1992;176(5):1453-7.
23. Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Wölfel C, De Plaen E, Lethé B, et al. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*. 1 août 1993;178(2):489-95.
24. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by

autologous T cells infiltrating into tumor. Proc Natl Acad Sci U S A. 26 avr 1994;91(9):3515-9.

25. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, et al. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. Proc Natl Acad Sci U S A. 5 juill 1994;91(14):6458-62.

26. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. Ann Surg. sept 1998;228(3):307-19.

27. Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. Cancer J Sci Am. févr 2000;6 Suppl 1:S11-4.

28. Eggermont AMM, Suci S, MacKie R, Ruka W, Testori A, Kruit W, et al. Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. Lancet. 1 oct 2005;366(9492):1189-96.

29. Hauschild A, Weichenthal M, Rass K, Linse R, Ulrich J, Stadler R, et al. Prospective randomized multicenter adjuvant dermatologic cooperative oncology group trial of low-dose interferon alfa-2b with or without a modified high-dose interferon alfa-2b induction phase in patients with lymph node-negative melanoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 20 juill 2009;27(21):3496-502.

30. Eggermont AMM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WHJ, Marsden J, et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. Lancet. 12 juill 2008;372(9633):117-26.

31. Kammula US, White DE, Rosenberg SA. Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. Cancer. 15 août 1998;83(4):797-805.

32. Weber J. Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events. The Oncologist. juill 2007;12(7):864-72.

33. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. Clin Ther. 1 avr 2015;37(4):764-82.

34. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med. 28 juin 2012;366(26):2455-65.

35. Hodi FS, Sznol M, McDermott DF, Carvajal RD, Lawrence DP, Topalian SL, et al. Clinical activity and safety of anti-PD-1 (BMS-936558, MDX-1106) in patients with advanced melanoma (MEL). ASCO Meet Abstr. 20 mai 2012;30(15_suppl):8507.

36. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med.* 9 avr 1987;316(15):889-97.
37. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 6 oct 2006;314(5796):126-9.
38. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 oct 2004;101 Suppl 2:14639-45.
39. Dréno B, Nguyen J-M, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, et al. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother CII.* nov 2002;51(10):539-46.
40. Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, Thor Straten P, Svane IM. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother CII.* janv 2009;58(1):1-14.
41. Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell.* 10 août 2001;106(3):271-4.
42. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer.* avr 2012;12(4):265-77.
43. Lombardi VC, Khaiboullina SF, Rizvanov AA. Plasmacytoid dendritic cells, a role in neoplastic prevention and progression. *Eur J Clin Invest.* janv 2015;45 Suppl 1:1-8.
44. Paczesny S, Ueno H, Fay J, Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer. *Semin Cancer Biol.* déc 2003;13(6):439-47.
45. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* févr 1997;9(1):10-6.
46. Caux C. Pathways of development of human dendritic cells. *Eur J Dermatol EJD.* sept 1998;8(6):375-84.
47. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* mars 2002;2(3):151-61.
48. Liu Y-J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:275-306.
49. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin.* oct 2012;62(5):309-35.

50. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* janv 1996;2(1):52-8.
51. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* mars 1998;4(3):328-32.
52. Thurner B, Röder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods.* 1 févr 1999;223(1):1-15.
53. Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, et al. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 sept 2000;165(6):3492-6.
54. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* avr 2003;15(2):138-47.
55. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, et al. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med.* 20 mai 2002;195(10):1279-88.
56. Buelens C, Bartholomé EJ, Amraoui Z, Boutriaux M, Salmon I, Thielemans K, et al. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood.* 1 févr 2002;99(3):993-8.
57. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, et al. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med.* 15 mai 2000;191(10):1777-88.
58. Mazouz N, Detournay O, Buelens C, Renneson J, Trakatelli M, Lambermont M, et al. Immunostimulatory properties of human dendritic cells generated using IFN-beta associated either with IL-3 or GM-CSF. *Cancer Immunol Immunother Cll.* oct 2005;54(10):1010-7.
59. Breckpot K, Corthals J, Bonehill A, Michiels A, Tuyaeerts S, Aerts C, et al. Dendritic cells differentiated in the presence of IFN- β and IL-3 are potent inducers of an antigen-specific CD8+ T cell response. *J Leukoc Biol.* oct 2005;78(4):898-908.
60. Detournay O, Mazouz N, Goldman M, Toungouz M. IL-6 produced by type I IFN DC controls IFN- γ production by regulating the suppressive effect of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol.* mai 2005;66(5):460-8.

61. Demoulin S, Roncarati P, Delvenne P, Hubert P. Production of large numbers of plasmacytoid dendritic cells with functional activities from CD34(+) hematopoietic progenitor cells: use of interleukin-3. *Exp Hematol.* avr 2012;40(4):268-78.
62. Tel J, Aarntzen EHJG, Baba T, Schreiber G, Schulte BM, Benitez-Ribas D, et al. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res.* 1 févr 2013;73(3):1063-75.
63. Ratzinger G, Baggery J, de Cos MA, Yuan J, Dao T, Reagan JL, et al. Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 août 2004;173(4):2780-91.
64. Romano E, Rossi M, Ratzinger G, de Cos M-A, Chung DJ, Panageas KS, et al. Peptide-loaded Langerhans cells, despite increased IL15 secretion and T-cell activation in vitro, elicit antitumor T-cell responses comparable to peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells in vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 avr 2011;17(7):1984-97.
65. Anguille S, Lion E, Van den Bergh J, Van Acker HH, Willems Y, Smits EL, et al. Interleukin-15 dendritic cells as vaccine candidates for cancer immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother.* sept 2013;9(9):1956-61.
66. Ueno H, Schmitt N, Klechevsky E, Pedroza-Gonzalez A, Matsui T, Zurawski G, et al. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev.* mars 2010;234(1):199-212.
67. Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol.* juin 2014;15(7):e257-67.
68. De Vries IJM, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Engelen LPH, Ruiter DJ, Gerritsen M-JP, et al. Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 nov 2003;9(14):5091-100.
69. Ridolfi R, Petrini M, Fiammenghi L, Stefanelli M, Ridolfi L, Ballardini M, et al. Improved overall survival in dendritic cell vaccination-induced immunoreactive subgroup of advanced melanoma patients. *J Transl Med.* 2006;4:36.
70. Davis ID, Chen Q, Morris L, Quirk J, Stanley M, Tavarner ML, et al. Blood dendritic cells generated with Flt3 ligand and CD40 ligand prime CD8+ T cells efficiently in cancer patients. *J Immunother Hagerstown Md 1997.* oct 2006;29(5):499-511.
71. Kyte JA, Mu L, Aamdal S, Kvalheim G, Dueland S, Hauser M, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther.* oct 2006;13(10):905-18.
72. Wilgenhof S, Van Nuffel AMT, Benteyn D, Corthals J, Aerts C, Heirman C, et al. A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell

immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. oct 2013;24(10):2686-93.

73. Van Nuffel AMT, Benteyn D, Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, Neyns B, et al. Intravenous and intradermal TriMix-dendritic cell therapy results in a broad T-cell response and durable tumor response in a chemorefractory stage IV-M1c melanoma patient. *Cancer Immunol Immunother CII*. juill 2012;61(7):1033-43.

74. Bonehill A, Tuyaeerts S, Van Nuffel AMT, Heirman C, Bos TJ, Fostier K, et al. Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding mRNA. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. juin 2008;16(6):1170-80.

75. González FE, Ortiz C, Reyes M, Dutzan N, Patel V, Pereda C, et al. Melanoma cell lysate induces CCR7 expression and in vivo migration to draining lymph nodes of therapeutic human dendritic cells. *Immunology*. juill 2014;142(3):396-405.

76. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Mortarini R, Baldassari P, Guidetti A, Gallino GF, et al. Boosting T cell-mediated immunity to tyrosinase by vaccinia virus-transduced, CD34(+)-derived dendritic cell vaccination: a phase I trial in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 août 2004;10(16):5381-90.

77. Schneble EJ, Yu X, Wagner T, Peoples GE. Novel dendritic cell-based vaccination in late stage melanoma. *Hum Vaccines Immunother*. 14 mai 2014;10(11).

78. Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, Milling A, Thiemann M, Sharav T, et al. Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine*. 18 mars 2005;23(17-18):2367-73.

79. Aarntzen EHJG, Schreibelt G, Bol K, Lesterhuis WJ, Croockewit AJ, de Wilt JHW, et al. Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses in stage III and IV melanoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 oct 2012;18(19):5460-70.

80. Son C-H, Bae J-H, Shin D-Y, Lee H-R, Yang K, Park Y-S. Antitumor effect of dendritic cell loaded ex vivo and in vivo with tumor-associated antigens in lung cancer model. *Immunol Invest*. 2014;43(5):447-62.

81. Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, Kaabinejadian S, Hundal J, Petti AA, et al. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science*. 2 avr 2015;

82. Lesimple T, Neidhard E-M, Vignard V, Lefeuvre C, Adamski H, Labarrière N, et al. Immunologic and clinical effects of injecting mature peptide-loaded dendritic cells by intralymphatic and intranodal routes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 déc 2006;12(24):7380-8.

83. Lesterhuis WJ, de Vries IJM, Schreibelt G, Lambeck AJA, Aarntzen EHJG, Jacobs JFM, et al. Route of administration modulates the induction of dendritic cell

vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 sept 2011;17(17):5725-35.

84. Edele F, Dudda JC, Bachtanian E, Jakob T, Pircher H, Martin SF. Efficiency of dendritic cell vaccination against B16 melanoma depends on the immunization route. *PLoS One.* 2014;9(8):e105266.

85. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lyerly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res.* 1 janv 1999;59(1):56-8.

86. Aarntzen EHJG, Srinivas M, Bonetto F, Cruz LJ, Verdijk P, Schreibelt G, et al. Targeting of 111In-labeled dendritic cell human vaccines improved by reducing number of cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mars 2013;19(6):1525-33.

87. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 1 sept 2001;61(17):6451-8.

88. Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med.* 6 déc 1999;190(11):1669-78.

89. Leonhartsberger N, Ramoner R, Falkensammer C, Rahm A, Gander H, Hörtl L, et al. Quality of life during dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother CII.* sept 2012;61(9):1407-13.

90. Trakatelli M, Toungouz M, Blocklet D, Dodoo Y, Gordower L, Laporte M, et al. A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother CII.* avr 2006;55(4):469-74.

91. Widén K, Mozaffari F, Choudhury A, Mellstedt H. Overcoming immunosuppressive mechanisms. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* sept 2008;19 Suppl 7:vii241-7.

92. Triozzi PL, Khurram R, Aldrich WA, Walker MJ, Kim JA, Jaynes S. Intratumoral injection of dendritic cells derived in vitro in patients with metastatic cancer. *Cancer.* 15 déc 2000;89(12):2646-54.

93. Guo J, Zhu J, Sheng X, Wang X, Qu L, Han Y, et al. Intratumoral injection of dendritic cells in combination with local hyperthermia induces systemic antitumor effect in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1 juin 2007;120(11):2418-25.

94. Nair S, McLaughlin C, Weizer A, Su Z, Boczkowski D, Dannull J, et al. Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for ex vivo maturation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 déc 2003;171(11):6275-82.

95. Sauder DN, Skinner RB, Fox TL, Owens ML. Topical imiquimod 5% cream as an effective treatment for external genital and perianal warts in different patient populations. *Sex Transm Dis.* févr 2003;30(2):124-8.
96. Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med.* 11 juin 2007;204(6):1441-51.
97. Zhu K-J, Cen J-P, Lou J-X, Wang Q, Zhang X, Xu Y, et al. Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* avr 2009;9(4):412-7.
98. Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol.* oct 2002;27(7):571-7.
99. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 févr 2005;174(3):1259-68.
100. Prins RM, Craft N, Bruhn KW, Khan-Farooqi H, Koya RC, Stripecke R, et al. The TLR-7 agonist, imiquimod, enhances dendritic cell survival and promotes tumor antigen-specific T cell priming: relation to central nervous system antitumor immunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 janv 2006;176(1):157-64.
101. Craft N, Bruhn KW, Nguyen BD, Prins R, Lin JW, Liau LM, et al. The TLR7 agonist imiquimod enhances the anti-melanoma effects of a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 août 2005;175(3):1983-90.
102. Prins RM, Soto H, Konkankit V, Odesa SK, Eskin A, Yong WH, et al. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mars 2011;17(6):1603-15.
103. Fehres CM, Bruijns SCM, van Beelen AJ, Kalay H, Ambrosini M, Hooijberg E, et al. Topical rather than intradermal application of the TLR7 ligand imiquimod leads to human dermal dendritic cell maturation and CD8+ T-cell cross-priming. *Eur J Immunol.* août 2014;44(8):2415-24.
104. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother CII.* mai 2007;56(5):641-8.
105. Ellebaek E, Engell-Noerregaard L, Iversen TZ, Froesig TM, Munir S, Hadrup SR, et al. Metastatic melanoma patients treated with dendritic cell vaccination, Interleukin-2 and metronomic cyclophosphamide: results from a phase II trial. *Cancer Immunol Immunother CII.* oct 2012;61(10):1791-804.
106. Baldueva IA, Novik AV, Moiseenko VM, Nekhaeva TL, Danilova AB, Danilov AO, et al. [Phase II clinical trial of autologous dendritic cell vaccine with immunologic adjuvant in cutaneous melanoma patients]. *Vopr Onkol.* 2012;58(2):212-21.

107. Buche S. Intérêts de l'imiquimod pour l'optimisation des vaccinations par cellules dendritiques dans le mélanome métastatique. Mémoire pour le Diplôme d'Etudes Spécialisées de Dermatologie. Université du Droit et de la Santé-Lille 2. Faculté de Médecine Henri Warembourg.Lille, 2009.
108. Simeone E, Gentilcore G, Giannarelli D, Grimaldi AM, Caracò C, Curvietto M, et al. Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother* CII. juill 2014;63(7):675-83.
109. Blank CU, Enk A. Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. *Int Immunol*. 18 juill 2014;
110. Di Giacomo AM, Calabrò L, Danielli R, Fonsatti E, Bertocci E, Pesce I, et al. Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who responded to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access programme. *Cancer Immunol Immunother* CII. juin 2013;62(6):1021-8.
111. Saad ED, Buyse M. Overall survival: patient outcome, therapeutic objective, clinical trial end point, or public health measure? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mai 2012;30(15):1750-4.
112. Madan RA, Gulley JL, Fojo T, Dahut WL. Therapeutic cancer vaccines in prostate cancer: the paradox of improved survival without changes in time to progression. *The Oncologist*. 2010;15(9):969-75.
113. Lowe DB, Bose A, Taylor JL, Tawbi H, Lin Y, Kirkwood JM, et al. Dasatinib promotes the expansion of a therapeutically superior T-cell repertoire in response to dendritic cell vaccination against melanoma. *Oncoimmunology*. 1 janv 2014;3(1):e27589.
114. Jacobs JFM, Punt CJA, Lesterhuis WJ, Suttmuller RPM, Brouwer HM-LH, Scharenborg NM, et al. Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase I/II study in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 oct 2010;16(20):5067-78.
115. Jacobs JFM, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJM, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol*. janv 2012;13(1):e32-42.
116. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*. déc 2005;115(12):3623-33.
117. Deveza E, Vitte F, Dupond A-S, Lassabe C, Raffoul J, Petrella T, et al. Cellules de Langerhans et histiocytome, étude immuno-histochimique à propos de 53 cas. *Ann Dermatol Vénéréologie*. déc 2013;140(12):S468-9.
118. Bouloc A. Les cellules dendritiques cutanées humaines. *médecine/sciences*. 2001;17(4):465.

119. Kim A, Noh Y-W, Kim KD, Jang Y-S, Choe Y-K, Lim J-S. Activated natural killer cell-mediated immunity is required for the inhibition of tumor metastasis by dendritic cell vaccination. *Exp Mol Med*. 31 oct 2004;36(5):428-43.
120. Bouwer AL, Saunderson SC, Caldwell FJ, Damani TT, Pelham SJ, Dunn AC, et al. NK cells are required for dendritic cell-based immunotherapy at the time of tumor challenge. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 mars 2014;192(5):2514-21.
121. Lion E, Smits ELJM, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI. NK cells: key to success of DC-based cancer vaccines? *The Oncologist*. 2012;17(10):1256-70.
122. Boudreau JE, Bridle BW, Stephenson KB, Jenkins KM, Brunellière J, Bramson JL, et al. Recombinant vesicular stomatitis virus transduction of dendritic cells enhances their ability to prime innate and adaptive antitumor immunity. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. août 2009;17(8):1465-72.
123. De Vries IJM, Bernsen MR, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Strijk SP, Gerritsen M-JP, et al. Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 août 2005;23(24):5779-87.
124. Nakai N, Katoh N, Germeraad WTV, Kishida T, Ueda E, Takenaka H, et al. Immunohistological analysis of peptide-induced delayed-type hypersensitivity in advanced melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination. *J Dermatol Sci*. janv 2009;53(1):40-7.
125. Sims RB. Development of sipuleucel-T: autologous cellular immunotherapy for the treatment of metastatic castrate resistant prostate cancer. *Vaccine*. 19 juin 2012;30(29):4394-7.
126. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 29 juill 2010;363(5):411-22.
127. Ott PA, Bhardwaj N. Impact of MAPK Pathway Activation in BRAF(V600) Melanoma on T Cell and Dendritic Cell Function. *Front Immunol*. 2013;4:346.
128. Knight DA, Ngiow SF, Li M, Parmenter T, Mok S, Cass A, et al. Host immunity contributes to the anti-melanoma activity of BRAF inhibitors. *J Clin Invest*. mars 2013;123(3):1371-81.
129. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 mars 2013;19(5):1225-31.
130. Wilmott JS, Long GV, Howle JR, Haydu LE, Sharma RN, Thompson JF, et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 mars 2012;18(5):1386-94.

131. Ott PA, Henry T, Baranda SJ, Frleta D, Manches O, Bogunovic D, et al. Inhibition of both BRAF and MEK in BRAF(V600E) mutant melanoma restores compromised dendritic cell (DC) function while having differential direct effects on DC properties. *Cancer Immunol Immunother* CII. avr 2013;62(4):811-22.
132. Koya RC, Mok S, Otte N, Blacketer KJ, Comin-Anduix B, Tumei PC, et al. BRAF inhibitor vemurafenib improves the antitumor activity of adoptive cell immunotherapy. *Cancer Res*. 15 août 2012;72(16):3928-37.
133. Vella LJ, Pasam A, Dimopoulos N, Andrews M, Knights A, Puaux A-L, et al. MEK inhibition, alone or in combination with BRAF inhibition, affects multiple functions of isolated normal human lymphocytes and dendritic cells. *Cancer Immunol Res*. avr 2014;2(4):351-60.
134. Met O, Wang M, Pedersen AE, Nissen MH, Buus S, Claesson MH. The effect of a therapeutic dendritic cell-based cancer vaccination depends on the blockage of CTLA-4 signaling. *Cancer Lett*. 18 janv 2006;231(2):247-56.
135. Ribas A, Comin-Anduix B, Chmielowski B, Jalil J, de la Rocha P, McCannel TA, et al. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 oct 2009;15(19):6267-76.
136. Pierret L, Wilgenhof S, Corthals J, Roelandt T, Thielemans K, Neyns B. Correlation between prior therapeutic dendritic cell vaccination and the outcome of patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab. *ASCO Meet Abstr*. 20 mai 2009;27(15S):e20006.
137. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest*. juin 2008;118(6):1991-2001.
138. Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. *J Natl Cancer Inst*. 18 avr 2012;104(8):599-613.
139. Gajdosy D. Combination of chemotherapy and immunotherapy for cancer: a paradigm revisited. *Lancet Oncol*. janv 2007;8(1):2-3.
140. Kim K-W, Kim S-H, Shin J-G, Kim G-S, Son Y-O, Park S-W, et al. Direct injection of immature dendritic cells into irradiated tumor induces efficient antitumor immunity. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1 mai 2004;109(5):685-90.
141. Chen Z, Xia D, Bi X, Saxena A, Sidhu N, El-Gayed A, et al. Combined radiation therapy and dendritic cell vaccine for treating solid tumors with liver micro-metastasis. *J Gene Med*. avr 2005;7(4):506-17.
142. Teitz-Tennenbaum S, Li Q, Davis MA, Wilder-Romans K, Hoff J, Li M, et al. Radiotherapy combined with intratumoral dendritic cell vaccination enhances the therapeutic efficacy of adoptive T-cell transfer. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. août 2009;32(6):602-12.

143. Teitz-Tennenbaum S, Li Q, Rynkiewicz S, Ito F, Davis MA, McGinn CJ, et al. Radiotherapy potentiates the therapeutic efficacy of intratumoral dendritic cell administration. *Cancer Res.* 1 déc 2003;63(23):8466-75.
144. Teitz-Tennenbaum S, Li Q, Okuyama R, Davis MA, Sun R, Whitfield J, et al. Mechanisms involved in radiation enhancement of intratumoral dendritic cell therapy. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. mai 2008;31(4):345-58.
145. Dillman RO, Fogel GB, Cornforth AN, Selvan SR, Schiltz PM, DePriest C. Features associated with survival in metastatic melanoma patients treated with patient-specific dendritic cell vaccines. *Cancer Biother Radiopharm.* août 2011;26(4):407-15.
146. Barker CA, Postow MA. Combinations of radiation therapy and immunotherapy for melanoma: a review of clinical outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 avr 2014;88(5):986-97.
147. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N Engl J Med.* 8 mars 2012;366(10):925-31.

ANNEXES

Annexe 1 : Feuille d'observation du patient

[Etude DCI07-00]									
Code du patient:			n° de l'injection:			Date:			
Pour chaque groupe, noter un maximum de réaction pour chaque site d'injection									
¹ 0=Aucune, 1=Faible, 2=Modérée, 3=Sévère									
² 0 = Aucune, 1 = tiède, 2 = chaud									
REACTIONS LOCALES aux sites d'injection									
Injection sur chaque membre	type de réaction	Jour de l'injection		Jours post-injection					
		0 30'	6hr	1	2	3	4	5	6
Injection 1 Localisation :	Douleur ¹								
	Température ²								
	Rougeur ¹								
	Induration ¹								
	Ulcération ¹								
Injection 2 Localisation :	Douleur ¹								
	Température ²								
	Rougeur ¹								
	Induration ¹								
	Ulcération ¹								
REACTIONS GENERALES: cocher si présente									
	frissons								
	nausées								
	Malaise								
	Douleur Musculaire								
	Douleur articulaire								
	Maux de tête								
	Température orale (°C)								
Resté à la maison du à la réaction? (0=Non, 1=oui)									
Medication utilisée contre les douleurs/fièvre (0=Non, 1=oui)									
Noter tous les médicaments pris, la date et la dose: 1 2 3									

Annexe 2 : Lettre d'information et consentement éclairé du patient

Formulaire d'information et de consentement éclairé du patient participant à l'étude clinique
--

Titre du protocole

Etude clinique de phase II d'immunothérapie à base de cellules dendritiques autologues maturée in vivo au sein d'une métastase cutanée préalablement traitée par de l'imiquimod topique en association à du cyclophosphamide chez des malades atteints d'un mélanome cutané métastatique

Etude : DCI3/01

Madame ; Monsieur,

Le Dr Mortier vous invite à participer à une étude ayant pour but de tester un nouveau type de vaccin en association avec un traitement par une crème : l'imiquimod et une chimiothérapie : le cyclophosphamide. L'objectif de ce traitement est de stimuler efficacement votre système de défense (système immunitaire) afin qu'il combatte les cellules tumorales. Cette étude sera monocentrique, c'est-à-dire qu'elle ne sera réalisée qu'à Lille.

Inclusion dans l'étude

Dans un premier temps, votre médecin vous informera de la réalisation de l'essai clinique et vous remettra ce formulaire d'information et de consentement. Si vous acceptez de participer à l'étude vous aurez dans un deuxième temps, une visite dite de pré-inclusion. Lors de cette visite, le médecin répondra aux éventuelles questions que vous vous posez après lecture de ce formulaire d'inclusion. Après avoir répondu à vos questions, si vous acceptez de participer à l'étude il vous sera demandé de signer le formulaire d'inclusion en 3 exemplaires.

Au cours de la visite de pré-inclusion une analyse des paramètres suivants sera également réalisée :

Antécédents médicaux, chirurgicaux, de radiothérapie

Histoire de votre maladie

Examen clinique

Electrocardiogramme

Analyse des données du bilan radiologique.

Tests biologiques (hématologiques, biochimiques, coagulation, virologie)

Une infirmière de l'hôpital de jour de la Clinique de Dermatologie, réalisera les différents prélèvements sanguins :

-1 tube pour la formule sanguine : 5ml

-1 tube pour des analyses biochimiques (la créatine sérine, la bilirubine sérique, ASAT/ALAT et les LDH) : 10 ml

-1 tube pour le bilan de coagulation (TP/TCA) : 5ml

-1 tube pour le bilan immunologique (Ac anti nucléaires) : 5ml

-2 tubes pour les sérologies virales : VIH, VHB, VHC, TPHA, VDRL : 10ml

Test de grossesse (si nécessaire)

-1 tubes pour dosage des β HCG : 5ml

Après analyse de l'ensemble des données, si les critères d'inclusion sont bien respectés vous serez inclus dans l'étude

Rationnel et procédure de fabrication du vaccin:

Des études ont montré que les cellules dendritiques associés à d'autres substances peuvent stimuler une réponse du système immunitaire. Les cellules dendritiques sont rares et représentent moins de 1% du nombre total de vos globules blancs.

Parmi vos globules blancs il existe des cellules appelées monocytes. Ces cellules, présentes en grande quantité dans votre organisme peuvent être transformées en cellules dendritiques. Pour obtenir suffisamment de monocytes, un prélèvement (cytaphérèse) sera réalisé à l'aide d'une machine qui va séparer les cellules qui nous intéressent : les globules blancs et qui va vous restituer les autres cellules qui ne nous intéressent pas pour l'étude : les globules rouges et les plaquettes. Ce prélèvement durera environ trois heures. Au final 500 ml de sang vous seront prélevés. Dans certains cas le médecin peut placer temporairement un cathéter pour faciliter la collecte de votre sang.

Votre organisme reconstituera les cellules prélevées entre 24 h et 48 heures.

Puis le prélèvement sera transporté à la plate forme de thérapie cellulaire localisée à la Faculté de Médecine de Lille afin de préparer le vaccin

A partir de vos globules blancs, les monocytes vont être purifiés dans des conditions de stérilité hautement contrôlées et mis dans une armoire à 37°C avec des substances qui vont leur permettre de se transformer en cellules dendritiques, en 5 jours. Puis, les cellules seront congelées jusqu'au jour de l'injection. La quantité de cellules dendritiques obtenue permettra de générer au minimum 9 vaccins.

A toutes les étapes de fabrication, si la totalité de vos cellules n'est pas utilisée pour la préparation du vaccin, elles seront utilisées pour des recherches en laboratoire ou elles seront détruites. En aucun cas, elle ne seront administrées à d'autres personnes.

Le principe est donc de purifier des cellules présentes dans votre sang, de les modifier afin qu'elles puissent stimuler votre système immunitaire pour que celui-ci combatte efficacement les cellules tumorales

Traitement :

Le jour de l'injection les cellules dendritiques seront décongelées puis séparées en 2 petits lots puis injectées au sein de 2 métastases cutanées distinctes préalablement traitées par imiquimod (ALDARA) pendant 5 jours. Le traitement par imiquimod sera poursuivi durant les 2 jours qui suivent la vaccination. Après leur injection, les cellules dendritiques se rendront au niveau des ganglions pour y activer des lymphocytes T. Une fois activés, ils diffuseront dans l'ensemble de votre organisme dans l'objectif de détruire les cellules tumorales.

Les vaccinations seront initialement réalisées toutes les 2 semaines. Chaque vaccin sera systématiquement réinjecté au même endroit

Parallèlement aux vaccinations, vous prendrez un traitement par cyclophosphamide, chimiothérapie généralement très bien tolérée permettant de rendre plus efficace le vaccin. Ce traitement consistera en la prise une fois par jour par voie orale de 2 comprimés de 50 mg de cyclophosphamide pendant une semaine. Ce traitement sera pris une semaine sur 2, et ce durant toute l'étude. En cas d'intolérance au cyclophosphamide, sa posologie sera diminuée. En cas de persistance d'une intolérance, ce traitement pourra être interrompu tout en

maintenant les vaccinations selon le même schéma. Afin de dépister une éventuelle toxicité biologique induite par le cyclophosphamide, un bilan biologique (identique à celui réalisé lors de la visite d'inclusion) sera réalisé toutes les 2 semaines. Durant la même prise de sang, un prélèvement de 10 ml sur tube hépariné sera à chaque fois réalisé afin d'évaluer le retentissement de cette chimiothérapie sur votre système immunitaire.

Le jour de l'injection du vaccin, vous viendrez à l'Hôpital de jour de la Clinique de Dermatologie à l'Hôpital Huriez au CHRU de Lille. Vous aurez une consultation avec le médecin.

Ensuite, vous recevrez le vaccin. Après la première vaccination, vous resterez en observation 2 heures. Votre pouls, votre tension artérielle et votre température seront pris juste après la vaccination, puis toutes les 30 minutes pendant 2 heures. Passé ce délai, et si les paramètres vitaux ne sont pas revenus à leur niveau initial, la surveillance pourra se prolonger jusqu'à 4 heures post injection. Pour les injections suivantes, et si aucune réaction immédiate n'a été observé après la première vaccination, la surveillance pourra être réalisée selon les mêmes modalités mais sur une période de 1 heure.

Vous repartirez chez vous avec un carnet d'observation à remplir : vous noterez votre température quotidiennement pendant les 6 jours qui suivent la vaccination. Vous devez noter sur cette feuille tous les médicaments éventuels que vous prenez (dose, date), tous les éventuels symptômes que vous avez ressentis aux sites d'injections ainsi que sur le plan général (fièvre, frisson, nausée...). Vous rapporterez cette feuille d'observation à la prochaine visite.

Les vaccinations seront progressivement espacées (cf schéma ci-joint).

Parallèlement au traitement, des évaluations radiologiques des métastases du mélanome seront réalisées régulièrement aux semaines 2/ 10/ 18 et 26 (cf schéma ci-joint).

A la fin du troisième cycle, un bilan complet sera réalisé afin de connaître l'efficacité du vaccin associé au traitement par cyclophosphamide. Ce bilan consistera en un examen clinique complet, des examens sanguins (identiques à ceux du bilan pré-inclusion), un bilan radiologique (bilan S26).

En fonction de l'évolution de la maladie, vous pourrez continuer le protocole. Dans ce cas, une nouvelle cytophèrese devra être réalisée. Cette seconde cytophèrese permettra de générer selon les mêmes modalités que définit précédemment, 9 nouveaux lots de vaccins.

Bénéfices

L'avantage potentiel que vous pouvez espérer tirer de cette étude est une stabilisation, une diminution, voire une élimination de votre tumeur. Bien que l'on espère que cette recherche vous sera profitable ou qu'elle aidera d'autres personnes, rien ne permet d'assurer qu'elle vous aidera directement. Vous serez informé(e) de son état d'avancement ainsi que de tout nouvel élément susceptible d'influencer votre volonté de participer.

Risques

Risques liés à la cytophèrese

Le prélèvement de sang pour la préparation des vaccins suivi de la réinjection du plasma et des globules rouges peut engendrer des palpitations momentanées, ainsi qu'une accélération du rythme cardiaque et une diminution de la tension artérielle. Il vous sera donc demandé de rester couché(e) jusqu'à la disparition de ces manifestations, lorsque le plasma et les globules rouges auront été réinjectés dans votre sang. L'adjonction d'un anticoagulant, le CPDA (acide citrique, citrate sodique, phosphate de sodium, adénine) empêchera la coagulation du sang prélevé ; cet anticoagulant sera toujours présent dans le plasma qui vous sera réinjecté. Ces quatre composants sont totalement non toxiques et n'influenceront pas la coagulation du sang

dans la mesure où ils se diluent rapidement et perdent leurs effets une fois réinjectés dans le sang.

Risques liés au vaccin

Depuis plus de quinze ans de nombreux essais de ce type ont été réalisés. Dans aucun de ces essais, il a été décrit de toxicité aigue ou d'effets indésirables graves.

Des réactions allergiques aux composants du vaccin (telles qu'urticaire, respiration sifflante, poussées de fièvre et frissons) constituent des risques théoriques, quoique improbables. Par contre, suite à l'activation de votre système immunitaire, une réaction inflammatoire pourrait se produire à l'endroit de l'injection (rougeur, induration, douleur, démangeaison, fièvre), voire même des manifestations pseudo-grippales telles que fièvre, frissons, douleurs musculaires et articulaires ou maux de tête. Si nécessaire, ces réactions pourront faire l'objet d'un traitement symptomatique.

Beaucoup plus rarement, suite à l'activation de votre système immunitaire, il est possible, que la réaction immunitaire affecte les mélanocytes normaux ce qui se traduirait alors par une dépigmentation de la peau, appelée vitiligo. Ce phénomène peut également se développer spontanément chez des malades souffrant d'un mélanome .

Le traitement qu'implique le présent protocole pourrait s'accompagner de risques imprévisibles pour l'enfant à naître si une femme devait débiter une grossesse au cours des immunisations. C'est pourquoi, nous réaliserons pour les participantes en âge de procréer un test de grossesse. De même, les malades seront tenues de recourir à des moyens contraceptifs efficaces tout au long de leur participation à l'étude. Quant aux hommes, ils veilleront à prendre des mesures de contraception efficaces, soit pour eux-mêmes, soit pour leurs partenaires, afin d'éviter d'éventuelles grossesses au cours de la participation à l'étude. Si une patiente devait débiter une grossesse au cours de l'essai, le traitement serait interrompu.

Risques liés à la prise de cyclophosphamide (ENDOXAN):

La tolérance générale de cette chimiothérapie qui sera prise à petite dose par voie orale 1 semaine sur 2 à la posologie de 100mg par jour est bonne. Une diminution des globules blancs, des plaquettes et du taux d'hémoglobine est possible. Cependant, elle est toujours spontanément réversible après diminution ou arrêt du cyclophosphamide. Certains patients peuvent présenter des nausées voir des vomissements, qui sont facilement prévenus ou supprimés à l'aide d'un traitement adapté. Exceptionnellement à la dose utilisée des chutes de cheveux peuvent se produire, elles sont alors transitoires et réversibles.

Ont également été décrits de façon exceptionnelles des réactions cutanées parfois sévères, des sensations vertigineuses, des atteintes du pancréas (pancréatite).

Risques liés à l'utilisation d'imiquimod (ALDARA) :

Durant les cinq jours précédant la vaccination, le jour de la vaccination puis les 2 jours qui la suivent, il vous sera demandé d'appliquer sur les 2 métastases cutanées au sein desquelles seront injectées les cellules dendritiques de l'imiquimod. Ce traitement local est généralement très bien toléré. Il est cependant probable qu'au niveau de la zone d'application de la crème, puisse se produire un érythème, des érosions. Après application de l'imiquimod, il vous sera demandé de bien vous laver les mains afin d'éviter tout contact du topique avec les yeux.

Traitements alternatifs

Au stade de votre maladie, les options possibles sont les suivantes : chimiothérapie et si les tumeurs se limitent à un membre, perfusion avec une dose élevée de chimiothérapie locale. Bien que ces traitements puissent améliorer l'évolution de la maladie et dans certains cas

provoquer la disparition complète de toute tumeur détectable, aucun traitement n'est cependant à même d'empêcher une éventuelle rechute ou une progression par la suite c'est pour cette raison que nous vous proposons de façon alternative de participer à cette étude.

Indemnisation

Le CHRU de Lille en tant que promoteur de l'essai clinique en assume la responsabilité conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques. Pour que l'assurance souscrite dans le cadre de l'étude (police d'assurance ...) puisse s'appliquer, vous êtes tenu(e) de signaler à votre médecin tout signe susceptible de constituer une retombée négative du traitement.

Coûts médicaux et compensation

Dans le cadre de votre participation à l'étude, tous les tests et examens non exécutés en cours de traitement standard mais spécifiques à l'étude, ne vous seront pas facturés.

Les frais supplémentaires des procédures requises indépendamment de l'étude ne seront pas supportés par le promoteur. Toute autre pathologie qui serait observée en cours d'exécution des procédures d'étude sans être provoquée par celles-ci sera traitée dans le respect de la bonne pratique médicale, mais ne sera pas indemnisée par le promoteur. Les dépenses personnelles (téléphone, etc. ...) ne seront pas remboursées.

Si un problème nécessitant des soins médicaux devait survenir, votre médecin vous examinera et dispensera les soins requis. La facture sera envoyée à votre organisme d'assurance maladie ou à vous-même, comme elle le serait normalement.

Le promoteur a conclu une assurance visant à couvrir les coûts de tout dommage en rapport direct avec le traitement par vaccination antitumorale, dans la mesure où celui-ci est exécuté et suivi de la façon décrite dans le protocole d'étude et dans le manuel de l'investigateur. Aucune autre forme d'indemnité ne sera proposée.

Confidentialité

Les dossiers de recherche ainsi que les dossiers cliniques peuvent être examinés par le personnel affecté à vos soins, par le promoteur de l'étude ainsi que par les autorités médicales concernées. L'ensemble du personnel médical, ainsi que tout autre employé de l'hôpital et toute personne impliquée dans le traitement des données seront tenus d'observer la confidentialité de vos données personnelles dans la mesure où ils accèdent et manipulent des informations à caractère privé. Aucune information personnelle ne sera divulguée aux instances publiques ni à une quelconque autorité sauf dispositions légales ou réglementaires prévues en ce sens. Lors des analyses d'échantillons ou de données menées en dehors de l'hôpital, il ne pourra être fait mention ni de votre nom, ni d'aucun autre élément susceptible de vous identifier

Il est entendu que jamais votre nom ne figurera dans aucun rapport relatif à l'étude visée ici, et qu'il ne pourra être révélé à aucune tierce personne.

Droit de refus et de suspension

Si vous acceptez de participer à l'étude, c'est de votre plein gré et vous êtes libre de suspendre votre participation à tout moment. En l'état actuel, vous estimez que les explications fournies par votre médecin à propos de l'étude et des autres formes de soins possibles, ainsi que les informations contenues dans le présent document, sont de nature à vous permettre de prendre votre décision de participer ou non à l'étude. Si vous décidez de ne pas participer, toute autre option restera ouverte sans que votre choix ne joue en votre défaveur. Si vous décidez de

participer, vous gardez la faculté d'arrêter à tout moment.

En cas d'arrêt du protocole pour n'importe quelle raison, vous bénéficierez de tous les soins nécessaires compte tenu de vos besoins et de votre situation médicale. Votre refus éventuel de participer n'entraînera aucun préjudice.

Fin de l'étude

Il pourra être mis fin à votre participation à l'étude sans votre accord pour les motifs suivants :

- Si la tumeur devait augmenter et si le médecin investigateur estimait nécessaire d'entamer une autre forme de traitement.
- Si vous deviez développer des effets secondaires jugés dangereux par votre médecin.
- Si vous deviez refuser le(s) traitement(s) recommandé(s) par les médecins qui s'occupent de vous, ou si vous refusiez les tests destinés à juger de la sécurité et de l'efficacité du traitement.
- Si des éléments nouveaux devaient mettre en évidence un danger lié à l'étude.
- Si vous débutiez une grossesse.

Comme indiqués sous "droit de suspension" ci-dessus, vous pouvez à tout moment et à votre demande mettre fin à votre participation

Formulaire de recueil de consentement
--

Titre du protocole : Etude clinique de phase II d'immunothérapie à base de cellules dendritiques autologues maturée in vivo au sein d'une métastase cutanée préalablement traitée par de l'imiquimod topique en association à du cyclophosphamide chez des malades atteints d'un mélanome cutané métastatique

Etude : DCI3/01

Promoteur : CHRU de Lille

Je soussigné(e),

demeurant.....

Le docteur..... médecin investigateur, m'a proposé de participer à une étude ayant pour but de tester un nouveau type de vaccin en association avec un traitement par une crème : l'imiquimod et une chimiothérapie : le cyclophosphamide. L'objectif de ce traitement est de stimuler efficacement votre système de défense (système immunitaire) afin qu'il combatte les cellules tumorales.

Il m'a clairement précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche.

J'ai reçu une note d'information écrite présentant les modalités de déroulement de cette étude clinique et exposant les éléments suivants : but de la recherche, méthodologie, durée, contraintes, risques éventuels,

J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions me paraissant utiles pour la bonne compréhension de la lettre d'information et de recevoir des réponses claires et précises.

J'ai disposé d'un délai de réflexion suffisant avant de prendre ma décision.

Je certifie ne pas avoir dissimulé mes traitements actuels ou antérieurs, mes antécédents médicaux personnels ou familiaux, ma participation à des essais en cours

Si la totalité de mes cellules ne m'a pas été administrée, je suis d'accord, en signant ce consentement, que ces cellules soient utilisées pour des recherches en laboratoire ou qu'elles soient détruites. Elles ne seront pas administrées à d'autres personnes

J'accepte librement et volontairement de participer à la recherche décrite dans les conditions ci-dessus.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Je suis conscient que je peux arrêter à tout moment ma participation à cette recherche sans supporter aucune responsabilité. J'en informerai alors le médecin qui me suit dans cette étude soit par téléphone soit par courrier faxé ou posté

J'ai été informé que conformément à la réglementation sur les études cliniques, le Comité de Protection des Personnes a rendu un avis favorable pour la réalisation de cette recherche, en date du 0 / 0 / 200

Le promoteur de cette étude a souscrit une police d'assurance couvrant les participants à cette étude.

J'ai pris connaissance de mon droit d'accès et de rectification des informations nominatives

me concernant et qui sont traitées de manière automatisée. Toutes les données et informations qui me concernent seront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par des personnes désignées par le protocole et éventuellement par un représentant des autorités de santé.

Je pourrai à tout moment demander toute information complémentaire au médecin qui me suit dans cette étude Docteur L.MORTIER Clinique de Dermatologie Hôpital Claude Hurriez CHRU de Lille Tél : 03 20 44 41 93 Fax : 03 20 44 59 16

A l'issue de la recherche, vous serez informez des résultats globaux de cette étude selon la loi 2002-303 du 4 mars 2002 relative aux droits de malades art.L.1122-1

Fait à Lille, le / / 200

Fait à Lille, le / / 200

Signature de l'investigateur
ou de son représentant

Signature du volontaire, précédée
de la mention « lu et approuvé »

Ce document doit être paraphé par le volontaire et l'investigateur ou son représentant.

Fait en trois exemplaires : un pour le volontaire, un pour l'investigateur, un pour le promoteur

AUTEUR : Nom : LEPESANT

Prénom : Pauline

Date de Soutenance : Mardi 23 juin 2015

Titre de la Thèse : Immunothérapie à base de cellules dendritiques autologues couplée à une association imiquimod / cyclophosphamide chez des malades atteints d'un mélanome métastatique.

Thèse - Médecine - Lille 2015

Cadre de classement : Dermatologie

DES + spécialité : DES de Dermatologie - Vénérologie

Mots-clés : mélanome, immunothérapie, cellules dendritiques, vaccination, imiquimod, cyclophosphamide.

Résumé :

Contexte : La prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique a considérablement évolué ces dernières années avec le développement de thérapies ciblées et d'immunothérapies. L'immunothérapie à base de cellules dendritiques a pour objectif de capitaliser la capacité des cellules dendritiques à diriger les lymphocytes T et NK à devenir des effecteurs antitumoraux capables d'éradiquer les cellules malignes.

Méthode : Nous avons réalisé une étude prospective ouverte de phase II, monocentrique, dans le service de Dermatologie du CHRU de Lille, chez des patients atteints de mélanome métastatique entre mai 2010 et août 2013. Notre travail visait à évaluer l'efficacité d'une immunisation avec des cellules dendritiques autologues de type CD-13 par injection intra-tumorale au sein de métastases cutanées préalablement traitées par de l'imiquimod topique en association à un traitement par cyclophosphamide chez des patients atteints de mélanome métastatique.

Résultats : Cinq patients étaient inclus dans cette étude. Il était observé une réponse partielle, une stabilité de la maladie, une maladie lentement évolutive et deux progressions. La survie moyenne globale était de 29 mois et la survie moyenne sans progression de 7,2 mois. Aucun événement indésirable modéré ou sévère n'était survenu. La diminution des lymphocytes T régulateurs dans le sang périphérique n'était pas corrélée à une meilleure réponse clinique. Le cyclophosphamide ne permettait pas une diminution efficace des lymphocytes T régulateurs. Pour les patients ayant présenté une réponse partielle et une maladie lentement évolutive, une majoration de l'infiltrat lymphocytaire au sein des métastases cutanées était mise en évidence.

Conclusion : Malgré les résultats encourageants de ce protocole de vaccination à base de cellules dendritiques, cette technique nécessite d'être améliorée avant de pouvoir être proposée dans l'arsenal thérapeutique du mélanome métastatique.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur P. MARCHETTI

Asseseurs : Monsieur le Professeur M. HEBBAR

Madame le Docteur AS. HATZFELD

Madame le Docteur E. MARTIN DE LASSALLE

Monsieur le Professeur L. MORTIER (directeur de thèse)