



UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTE DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2019

THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Impact de l'immunothérapie anti-PD-1 sur l'homéostasie et le profil métabolique des cellules immunitaires de patients atteints d'un mélanome métastatique : étude translationnelle prospective

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2019 à 18 heures

Au Pôle Recherche

par Marie **LAMIAUX**

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Laurent MORTIER

Assesseurs :

Madame le Professeur Delphine STAUMONT-SALLÉ

Monsieur le Professeur Philippe MARCHETTI

Madame le Docteur Paola CORAZAO-ROZAS

Directeur de thèse :

Madame le Professeur Nadira DELHEM

Travail du Laboratoire d'Immunorégulation des Cancers Viro-induits (IRCV), équipe 6, UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, coordonné par le Professeur Nadira Delhem

Avertissement

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

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
ABRÉVIATIONS	4
RÉSUMÉ.....	6
INTRODUCTION.....	8
I] Mélanome : épidémiologie.....	9
II] Traitements actuels du mélanome	9
III] Immunothérapies anti-immune checkpoints	11
A) L'anti-CTLA-4.....	11
B) Les anti-PD-1	13
IV] Résistance aux immunothérapies anti-PD-1	14
V] Impact de PD-1 sur le métabolisme et sur la fonction lymphocytaire T.....	18
VI] Rôle de la reprogrammation métabolique sur les populations immunitaires	22
VII] Le métabolisme : potentiel biomarqueur et voie thérapeutique en Oncologie.....	24
ARTICLE	26
Study design and patients	30
Flow Cytometry Assays	30
Seahorse Metabolic Assays.....	32
DAS-ELISA	32
Purification of RNA using Trizol reagent	Erreur ! Signet non défini.
Reverse transcriptase	Erreur ! Signet non défini.
Real time quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) ...	Erreur ! Signet non défini.
Statistical analysis.....	33

Patient characteristics.....	34
Biological characteristics	34
Early modification of immune monitoring following the introduction of anti-PD-1 immunotherapy.....	35
Modification of the metabolic profile of immune populations under anti-PD-1 immunotherapy.....	37
OCR/ECAR ratio correlates with anti-tumor response.....	39
Figure 1: Study procedure timeline and clinicobiological features.	44
Figure 2: Immune and cytokine profile	45
Figure 3: Analysis of the metabolic changes of immune populations.....	46
Figure 4: Analysis of the correlation between the evolution of the tumor response and the metabolic modifications.....	47
Supplementary Figures.....	48
<i>DISCUSSION.....</i>	54
<i>CONCLUSION.....</i>	62
<i>PERSPECTIVES.....</i>	64
I] L'immunométabolisme : nouvelle cible thérapeutique anti-cancéreuse	65
II] Impact des associations ou des traitements séquentiels utilisés dans le mélanome.....	66
<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	69
<i>ANNEXES.....</i>	79
Annexe 1 : Classification du mélanome par l'AJCC, 8ème édition	80
Annexe 2 : Amendement au projet MELBASE validé par le CPP	81
Annexe 3 : Critères d'évaluation RECIST version 1.1	83

ABRÉVIATIONS

AJCC: American Joint Committee on Cancer	MEK: Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase
Akt/PKB: Protein Kinase B	MRI: Magnetic Resonance Imaging
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	mTORC1: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
AMPK: AMP-activated protein Kinase	Myc: Myelocytomatosis virus oncogene
ATP: Adénosine TriPhosphate	NK: Natural Killer
BRAF: B isoform Rapidly Accelerated fibrosarcoma	PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells
CD: Cluster of Differentiation	PBS: Phosphate Buffered Salin
CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire	PD-1: Programmed cell Death 1
CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité	PD-L1/2: Programmed Death-Ligand ½
CPA : Cellule Présentatrice d’Antigène	PGC-1α: Peroxisome proliferator activated receptor Gamma Coactivator -1 Alpha
CRP : C-Reactive Protein	PI3K: Phospholinositide 3- Kinase
CT- scan: Computerized Tomography - scan	OCR: Oxygen Consumption Rate
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4	OXPHOS: PHOSphorylation OXYdative
DAS-ELISA: Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	q-PCR: quantitative Polymerase Chain Reaction
DNA: DeoxyriboNucleic Acid	RECIST: Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
ECAR: Extracellular Acidification Rate	RNA: RiboNucleic Acid
FCCP: Carbonyl Cyanide-4- Phenylhydrazone	RPM: Revolutions Per Minute
FOXP3: FOlkhead boX P3	RT: Room Temperature
GAPDH : D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase	SSM: Superficial Spreading Melanoma
GLUT-1 : Transporteur de glucose de classe 1	TCR: T Cell Receptor
HIF1α : Hypoxia-Inducible Factor 1- Alpha	TGFβ: Transforming Growth Factor Beta
IL : Interleukine	TILs: Tumor-Infiltrating Lymphocytes
IFNγ : Interferon Gamma	TIM3: T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
LAG3 : Lymphocyte-Activation Gene 3	TNFα: Tumor Necrosis Factor Alpha
LDH: Lactate deshydrogenase	Tregs: lymphocytes T régulateurs
MAP Kinases: Mitogen Activated Protein Kinases	T-VEC: Talimogene laherparepVEC
MDSCs: Myeloid-Derived Suppressor Cells	

RÉSUMÉ

Contexte : Depuis 2011, le traitement du mélanome métastatique a connu une révolution avec l'instauration des anti-immune checkpoints. Malheureusement, 60 à 70% des patients montrent une résistance innée ou acquise sous anti-PD-1. Aucun biomarqueur prédictif n'existe à ce jour pour déterminer de manière précoce la réponse au traitement. Or, de nouvelles données montrent un lien entre les modifications métaboliques et l'acquisition des fonctions des cellules immunitaires et pourraient être utilisées comme potentiel biomarqueur de la réponse anti-tumorale.

Méthodes : Il s'agit d'une étude prospective et translationnelle menée dans le service de Dermatologie du CHRU de Lille dirigé par le Professeur Mortier. Les analyses ont été réalisées au sein de l'UMR 8161 – *Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies* à l'Institut de Biologie de Lille dirigé par le Professeur Delhem en collaboration avec l'équipe du Professeur Marchetti au sein de l'UMR-S-1172 au Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert. Etaient inclus, tous les patients porteurs d'un mélanome avancé, traités par immunothérapie anti-PD-1. Des prélèvements sanguins étaient réalisés avant traitement et à 3 semaines d'une première cure. La réponse tumorale était évaluée à 3 et 6 mois de l'immunothérapie.

Résultats : De mars 2018 à mars 2019, cinq patients ont été inclus. Il semblerait que les patients ayant une réponse ou une stabilité de la maladie à 6 mois de l'immunothérapie anti-PD-1 présentent une augmentation de fréquence lymphocytaire dès la première cure. Nous avons mis en évidence à 3 semaines de l'anti-PD-1, une élévation précoce de la capacité de réserve respiratoire chez les patients présentant une réponse à l'immunothérapie tandis que les patients non-répondeurs ou en stabilité de la maladie ne présentent pas de modifications. De façon très intéressante, nous avons également identifié des modifications précoces du ratio OCR/ECAR dès un cycle d'anti-PD-1, à partir des PBMCs des patients et qui sont corrélées de manière linéaire et significative à la réponse tumorale à 6 mois ($p=0,045$).

Conclusion : L'évaluation du ratio OCR/ECAR à partir des PBMCs de patients pourrait facilement être réalisée en pratique clinique et être utilisée comme potentiel marqueur de réponse précoce aux anti-PD-1. En cas de validation de ces données, cela permettrait une adaptation thérapeutique rapide chez les patients non-répondeurs et ainsi augmenter les chances de survie. Il s'agirait d'une aide dans l'évaluation de nouveaux protocoles thérapeutiques, comme les combinaisons ou traitements séquentiels dans le mélanome, voire s'appliquer à d'autres types de cancers traités par anti-PD-1.

INTRODUCTION

I] Mélanome : épidémiologie

Le mélanome est un cancer développé à partir des mélanocytes et se localise en majorité sur la peau, mais peut également atteindre les muqueuses. Sur le plan épidémiologique, plusieurs facteurs de risque individuel ont été identifiés tels que l'exposition solaire ou à des sources artificielles d'ultraviolet (UV), le nombre de naevi, le phototype et les facteurs génétiques (1). Le mélanome est un problème de santé publique avec 287 723 nouveaux cas chaque année dans le monde causant 60 712 décès selon l'analyse statistique globale des cancers en 2018 (2). En France, l'Institut National de Veille Sanitaire estime la prévalence du mélanome, en 2018, à 15 513 nouveaux cas et 1 975 décès par an (3). L'incidence du mélanome a nettement augmenté entre 1990 et 2018 en France, elle a été multipliée par un facteur 5 chez l'homme et par un facteur 3 chez la femme, cette augmentation concerne surtout les mélanomes de faible épaisseur (3). Avant l'ère des nouveaux traitements, son pronostic au stade avancé, correspondant au stade non résecable (IIIC/IIID) et au stade métastatique (IV) selon la classification de l'*American Joint Committee on Cancer (AJCC)* 8^{ème} édition (**Annexe 1**), était redoutable avec une survie globale estimée à 15% à 5 ans (4).

II] Traitements actuels du mélanome

Depuis 2011, la prise en charge thérapeutique du mélanome avancé a connu une véritable révolution avec la mise en évidence de mutations activatrices du gène *B isoform Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (BRAF) présentes dans plus de 50% des mélanomes cutanés et ayant permis le développement des thérapies ciblées. BRAF est une kinase qui fait partie de la voie de signalisation des *Mitogen Activated Protein*

Kinases (MAPKinases) et joue un rôle dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. En cas de mutation, cette voie est alors constitutivement active et devient un support de la tumorigenèse. Il existe 3 molécules ciblant spécifiquement la mutation BRAFV600 qui sont le dabrafénib, le vémurafénib et l'encorafénib. Du fait de la survenue inéluctable d'une résistance acquise après quelques mois de monothérapie ciblée, il a été développé secondairement les anti-MEK (*Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase*) ciblant la kinase MEK en aval de RAF avec 3 molécules : le tramétinib, le cobimétinib et le binimétinib, actuellement administrés en combinaison aux anti-RAF.

En parallèle, les immunothérapies ont été développées et ne ciblent pas cette fois la cellule tumorale mais visent plutôt l'activation du système immunitaire du patient. Il s'agit d'anticorps monoclonaux dont le but est de bloquer les points de contrôle immunitaires ou « *immune checkpoints* ». Deux molécules d'immunothérapie ont obtenu une indication dans le mélanome avancé qui sont l'anti-*Checkpoint cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4* (CTLA-4) et les anti-*Programmed cell death 1* (PD-1).

Récemment, il a été développé dans le mélanome une nouvelle immunothérapie spécifique qui est la virothérapie oncolytique. Il s'agit d'injecter un virus oncolytique le laherparepvec talimogène (T-VEC), virus de l'herpès simplex de type 1 génétiquement modifié dont la caractéristique est de se répliquer sélectivement dans les cellules tumorales entraînant une lyse tumorale avec libération d'antigènes tumoraux (5,6). De plus, ce virus a la capacité d'exprimer le GM-CSF permettant en parallèle une stimulation de la réponse immunitaire (5,6). Ce traitement est actuellement en cours d'étude en association avec les inhibiteurs d'immune checkpoints anti-CTLA-4 et anti-PD-1.

III] Immunothérapies anti-immune checkpoints

A) L'anti-CTLA-4

Le mélanome est, en effet, un des principaux cancers où l'impact du système immunitaire est majeur après les cancers viro-induits. Il a été rapporté effectivement plusieurs cas de régressions spontanées de mélanomes pouvant dans certains cas s'accompagner de manifestations auto-immunes comme par exemple le vitiligo. Les points de contrôle immunitaire sont des voies inhibitrices physiologiques du système immunitaire et sont indispensables pour le maintien de la tolérance du soi, en limitant la réponse immunitaire effectrice, dans le but de minimiser les dommages collatéraux aux tissus et ainsi sauvegarder l'homéostasie immunitaire. Cette homéostasie est un équilibre complexe entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs reçus par les lymphocytes, en cas de déséquilibre vers l'activation le risque est l'apparition de maladies auto-immunes alors qu'un déséquilibre vers l'inhibition favorisera le développement d'infections ou de cancers. Il a d'ailleurs été montré que les cellules cancéreuses pouvaient utiliser ces voies de contrôle immunitaire dans le but de freiner la réponse immune anti-tumorale et ainsi échapper à l'immunosurveillance.

L'ipilimumab est un anticorps monoclonal ciblant le récepteur CTLA-4, c'est la première immunothérapie à obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) dans le mélanome métastatique en 2011. Le CTLA-4 est un récepteur exprimé de manière transitoire lors de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (*Cluster of Differentiation*) mais également des T CD4⁺ auxiliaires. L'activation lymphocytaire est effective après réception de trois signaux, le premier étant la reconnaissance de l'antigène au sein du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exposé par la cellule présentatrice d'antigène (CPA) au *T Cell Receptor* (TCR) à la surface du

lymphocyte, le second signal est la synapse entre les ligands CD80/CD86 exprimés par la CPA et le CD28 présenté par le lymphocyte, enfin le dernier signal est celui des cytokines en particulier l'Interleukine 2 (IL-2). Le signal de co-stimulation *via* le CD28 entraîne l'augmentation de l'expression du CTLA-4 permettant un équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs. En effet, les ligands du CTLA-4 sont les mêmes que pour le CD28, c'est-à-dire le CD80 et le CD86 exprimés à la surface des CPA. Cependant, l'affinité du CTLA-4 pour le CD80/CD86 est 500 à 2 500 fois plus élevée que celle du CD28 favorisant le signal inhibiteur au dépend du signal de co-stimulation et modulant ainsi de manière précoce l'activation lymphocytaire au sein des organes lymphoïdes secondaires (7,8). Dans le cadre du cancer, l'équilibre entre les signaux de co-stimulation et les signaux de co-inhibition peut être altéré en faveur des signaux inhibiteurs *via* le signal par le CTLA-4 des lymphocytes T. Il a été montré que ce signal entraînait une diminution de sécrétion d'IL-2, un défaut d'expression du récepteur à l'IL-2 mais également un blocage lors de la phase de division cellulaire en phase G1/S caractérisant l'état d'anergie (9). Ces voies physiologiques d'inhibition de la réponse immunitaire sont donc utilisées par les cellules tumorales afin d'échapper au système immunitaire et constituent un des mécanismes d'échappement. Par ailleurs, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) ont une expression constitutive du récepteur CTLA-4 qui joue également un rôle majeur dans la régulation des fonctions immunosuppressives (7). Ainsi, l'anticorps anti-CTLA-4 en bloquant la synapse entre le récepteur membranaire CTLA-4 et les ligands CD80/CD86 a pour but d'amplifier l'activation lymphocytaire et inhiber l'activité immunosuppressive des Tregs, favorisant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale.

Cependant, du fait d'un impact sur les phases précoces de l'activation immunitaire et donc d'une action peu spécifique, l'immunothérapie anti-CTLA-4

présente un mauvais profil de tolérance avec l'induction de nombreuses manifestations auto-immunes parfois sévères avec une incidence de 72% d'effets indésirables de tous grades et de 24% de grades sévères (grade \geq 3) (10). Concernant les résultats obtenus sous ipilimumab, le taux de réponse était de 19% et le taux de survie était de 2,8 mois (11). Actuellement, dans le mélanome avancé, l'anticorps anti-CTLA-4 est proposé en première ligne en combinaison avec le nivolumab (anti-PD-1) permettant un taux de réponse plus élevé de 58% et un taux de survie de 11,5 mois (11).

B) Les anti-PD-1

A l'heure actuelle, il existe 2 anticorps monoclonaux anti-PD-1 : le nivolumab et le pembrolizumab. Ces molécules inhibent la glycoprotéine transmembranaire PD-1 exprimée à la surface de plusieurs cellules immunitaires dont les lymphocytes TCD4⁺/CD8⁺, les Tregs, les cellules dendritiques et les cellules NK (*Natural Killer*), son profil d'expression est donc bien plus large que celui du CTLA-4. Il s'agit d'un récepteur inhibiteur qui intervient plus tardivement, lors de la phase effectrice de la réponse immunitaire. Cette glycoprotéine interagit avec les ligands PD-L1 et PD-L2 (*Programmed Death-Ligand 1/2*) exprimés dans les tissus périphériques mais également par les cellules tumorales. La liaison entre PD-1 et PD-L1 interfère sur plusieurs voies de signalisation du lymphocyte T notamment sur sa capacité à sécréter des cytokines effectrices, sa capacité de survie et son métabolisme. L'anti-PD-1 peut également favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale en impactant la prolifération et les fonctions immunosuppressives des Tregs.

Il a été montré que les immunothérapies anti-PD-1 améliorent significativement la survie globale des patients avec un taux de réponse objectif de 32,9% pour le pembrolizumab (12) et de 40% pour le nivolumab (13) et une survie globale à 1 an de 72,9% pour le nivolumab (13) et de 68,4% pour le pembrolizumab (12). Ces deux molécules ont obtenu l'AMM dans le mélanome avancé depuis 2014 avec actuellement une indication en première ligne en monothérapie.

IV] Résistance aux immunothérapies anti-PD-1

Malheureusement, le taux de résistance innée aux immunothérapies anti-PD-1 est élevé et concerne 60% à 70% des patients atteints d'un mélanome métastatique (14). De plus, la proportion des patients présentant une réponse initiale aux anti-PD-1 et qui obtiennent une réponse à long terme reste faible : entre 10 et 30% en lien avec des mécanismes de résistance acquise par les cellules tumorales (15–17). Beaucoup d'études ont été réalisées pour tenter de comprendre quels sont les marqueurs de réponse à l'immunothérapie anti-PD-1. Cependant, peu de réponses ont été apportées du fait d'une hétérogénéité génétique du mélanome mais également à cause de la complexité des interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales. En effet, il existe plusieurs facteurs de résistance identifiés aux anti-PD-1. Par exemple, il a été montré que les cellules cancéreuses possédaient un récepteur à l'Interferon Gamma (IFN γ) et pouvaient donc s'adapter à la réponse immunitaire effectrice car lorsque le signal à l'IFN γ est reçu par la cellule tumorale, cette dernière exprime PD-L1 afin de freiner le système immunitaire *via* la synapse inhibitrice entre PD-L1 et PD-1 à la surface des lymphocytes (**Fig.A**). Ce mécanisme est accessible à l'immunothérapie anti-PD-1, cependant, les cellules

cancéreuses ont une importante capacité d'adaptation et peuvent perdre l'expression des récepteurs à l'IFN et ainsi de PD-L1 permettant d'échapper au traitement (18).

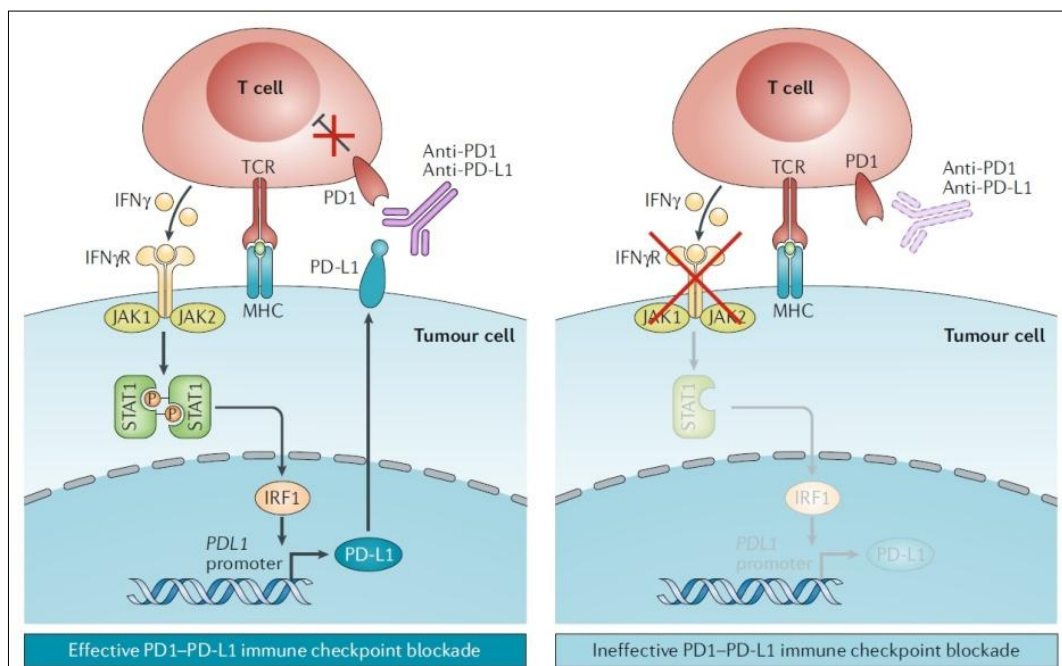


Figure A. Mécanisme de résistance adaptatif à l'immunothérapie anti-PD-1 par perte d'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses d'après l'article d'Anusha Kalbasi et al. *Nature*, 2019.

Plusieurs études sur le mélanome et sur d'autres types de cancer ont mis en évidence l'importance de la présence d'une forte densité de *Tumor-Infiltrating Lymphocytes/TILs* CD8⁺ cytotoxiques et son association à une meilleure survie chez les patients (19–21). Par ailleurs, le microenvironnement tumoral a un impact majeur dans la répression de la réponse effectrice lymphocytaire notamment par la présence de populations immunosuppressives telles que les Tregs, les *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) et les macrophages M2 qui vont émettre des signaux inhibiteurs notamment par la sécrétion de cytokines IL-10 et TGBβ (22). L'ensemble de ces signaux négatifs ainsi que l'exposition chronique et continue à des antigènes tumoraux provoquent une surexpression de récepteurs inhibiteurs en particulier PD-1

(22–24) mais également LAG3, CTLA-4, TIM3... sur les TILs. Ces récepteurs vont par compétition de l'ectodomaine avec le même ligand atténuer le signal des récepteurs co-activateurs. Ils vont également moduler des médiateurs intracellulaires atténuant les voies de signalisation activatrices à partir des récepteurs tels que le TCR et enfin vont induire l'expression de gènes inhibant la fonction effectrice (22). Ce phénotype cellulaire comportant donc une surexpression des récepteurs inhibiteurs, une diminution de sécrétion des cytokines effectrices (IL-2, IFN γ) et une réduction de la fonction cytotoxique (22,23) caractérise l'état d'épuisement lymphocytaire encore appelé phénotype « *exhausted* ». Cet état lymphocytaire dysfonctionnel a été découvert tout d'abord dans le cadre des infections chroniques puis dans le cancer (22) où il a été montré que le nombre de récepteurs inhibiteurs était en lien avec le niveau d'épuisement des lymphocytes T (23,25). En effet, dans un modèle de cancer du colon, il a été mis en évidence que le niveau d'expression cellulaire de PD-1 des TILs CD8⁺ était inversement corrélé à la fonction cellulaire (26). Alors qu'il a été montré dans le mélanome, que les clones de cellules T PD-1⁺ correspondaient aux cellules T spécifiques de l'antigène avec une avidité et une importante réactivité fonctionnelle avec la sécrétion d'IFN γ et de *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) après activation par rapport aux clones de cellules T PD-1⁻ (27). Il semblerait que c'est plutôt le niveau d'expression élevé de PD-1 qui reflète l'état d'épuisement avancé des lymphocytes. En effet, il a été montré dans un modèle murin d'infection chronique que les lymphocytes PD-1^{hi}CD8⁺ étaient incapables de restaurer leur fonction effectrice et dans la majorité des cas rentraient en apoptose après instauration d'un anti-PD-L1 (28). Il a également été mis en évidence dans un modèle tumoral murin que les lymphocytes T CD8⁺PD-1^{hi} ne répondaient pas à l'immunothérapie anti-PD-1 avec paradoxalement une augmentation du rapport

Treg/T CD8⁺ après traitement, contrairement, aux lymphocytes T CD8⁺PD-1^{lo} qui étaient sensibles à l'anticorps anti-PD-1 (26), reflétant une interaction complexe entre le niveau d'expression de PD-1 et la fonctionnalité lymphocytaire T. En effet, en cas de niveau d'expression élevé et malgré le blocage de la synapse PD-1/PD-L1, les altérations métaboliques semblent dépassées et sont accompagnées d'un stress oxydatif élevé empêchant la reprise d'une activité anabolique et paralysant les fonctionnalités lymphocytaires de manière irréversible conduisant alors à une résistance aux anti-PD-1 (9). Plusieurs études ont mis en évidence des modifications transcriptionnelles et épigénétiques suggérant que le phénotype « *exhausted* » n'est pas simplement un état cellulaire de dysfonctionnement transitoire mais représente plutôt un état stable de différenciation lymphocytaire (29,30). Par ailleurs, Miller et son équipe ont montré qu'il existait deux sous-types différents de lymphocytes T CD8⁺ de phénotype « *exhausted* » : les « *progenitor exhausted* » et les « *terminally exhausted* » (31). Il a été montré dans des modèles murins que l'immunothérapie anti-PD-1 pouvait agir sur les lymphocytes T CD8⁺ au stade de « *progenitor exhausted* » mais pas au stade « *terminally exhausted* » qui est un état irréversible (**Fig.B**). Ainsi l'anti-PD-1 induit la prolifération et la différenciation des TILs de type « *progenitor exhausted* » dans le microenvironnement tumoral, conduisant à une augmentation des TILs « *terminally exhausted* » cytotoxiques, mais à durée de vie limitée (31). Il a été mis en évidence chez les patients atteints de mélanome avancé que la fréquence des T CD8⁺ de type « *progenitor exhausted* » est corrélée à une durée de réponse à l'immunothérapie plus longue (31).

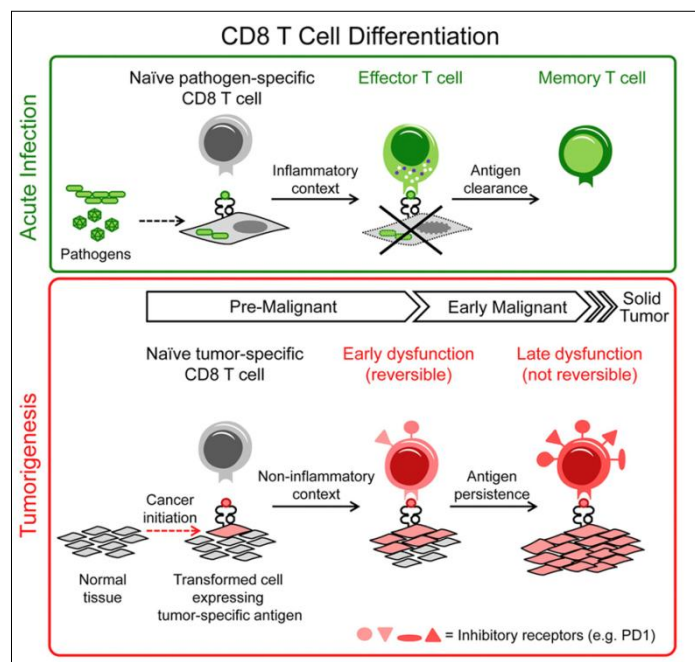


Figure B. Les étapes d'acquisition du phénotype « exhausted », état réversible puis irréversible des TILs durant la tumorigénèse d'après l'article d'Andrea Schietinger et al. *Cell*, 2016.

VJ Impact de PD-1 sur le métabolisme et sur la fonction lymphocytaire T

On sait que la différenciation des cellules T naïves en cellules T effectrices puis l'acquisition de son phénotype mémoire est corrélée à la capacité de la cellule T à reprogrammer son métabolisme afin d'assurer ses besoins énergétiques indispensables à l'acquisition de ses fonctionnalités (32,33). Les cellules T naïves/quiescentes comme les cellules T mémoires reposent principalement sur la phosphorylation oxydative (OXPHOS) qui est une voie efficace pour la production d'Adénosine TriPhosphate (ATP), en effet, 1 molécule de glucose génère 36 molécules d'ATP (32–34). Lorsqu'il existe une activation du lymphocyte T *via* le TCR, cela stimule plusieurs protéines telles que PI3K, Akt et mTOR permettant l'induction de l'anabolisme grâce à des facteurs de transcription comme Myc (*Myelocytomatosis virus oncogene*) et HIF1 (facteur induit par l'hypoxie 1) (34). Il a été montré que l'activation de mTOR induisait l'expression du transporteur de glucose Glut1

nécessaire à la prolifération des lymphocytes T et à la production de cytokines (35). De même, l'augmentation de la glycolyse et de l'absorption du glucose est corrélée à l'amélioration des fonctions effectrices après l'activation des cellules T (36). L'activation lymphocytaire entraîne donc l'utilisation préférentielle de la glycolyse aérobie malgré son manque de rentabilité, 1 molécule de glucose générant 2 ATP. Cependant, elle a l'avantage de fournir une production rapide d'ATP et d'apporter les substrats nécessaires à la prolifération cellulaire assurant ainsi une multiplication rapide des lymphocytes T spécifiques aux antigènes tumoraux (32,37,38). La glycolyse est également essentielle à la production de cytokines effectrices puisqu'il a été montré que la GAPDH (D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Deshydrogenase), une enzyme glycolytique, permettait la traduction de l'ARNm de l'IFN γ (38).

De même, le métabolisme des cellules cancéreuses se caractérise principalement par la glycolyse aérobie, cette particularité a été décrite par le Docteur Warburg qui obtient le prix Nobel en 1931 (39–41). En effet, sous l'action de proto-oncogène et/ou d'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur, il existe une amplification du métabolisme anabolique des cellules tumorales qui vont consommer de manière accrue le glucose et la glutamine afin d'assurer leur besoin de croissance et de prolifération (40,42). Ainsi, au sein du microenvironnement tumoral, les cellules cancéreuses vont entrer en compétition avec les cellules T pour l'utilisation du glucose (34,43). Ce manque de glucose va alors altérer l'activation lymphocytaire et par conséquent diminuer leurs fonctions d'expansion, de différenciation et d'effecteur marqué par un défaut de sécrétion d'IFN γ (44,45). Par ailleurs, la dérégulation du métabolisme des cellules tumorales crée un microenvironnement néfaste (**Fig.C**), caractérisé par un milieu hypoxique, acidotique et appauvri en éléments nutritifs comme le glucose, la glutamine et l'arginine, utilisés en grande quantité pour la

propre croissance tumorale limitant ainsi l'acquisition des fonctions lymphocytaires T qui ne peuvent plus assurer leur besoin bioénergétique (46). De plus, il a été montré que ces altérations métaboliques augmentaient l'expression de PD-1 des lymphocytes T et favorisaient leur différenciation en Tregs (38). PD-1 est donc un des marqueurs clés de l'état métabolique des cellules T reflétant indirectement leur capacité effectrice.

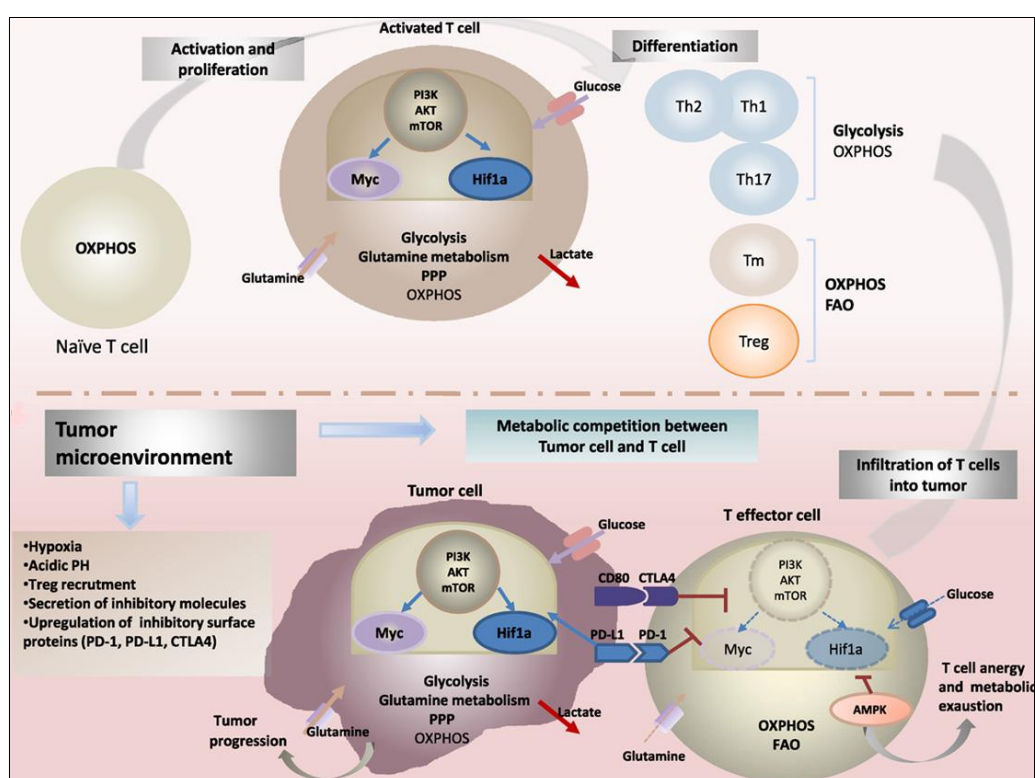


Figure C. La reprogrammation métabolique induite par l'activation des cellules T en périphérie et dans le microenvironnement tumoral en lien avec la réponse effectrice, d'après l'article de Koudhi S et al. *Frontiers*, 2017 (47).

Des études expérimentales ont montré que l'anti-PD-1 permettait d'augmenter les capacités glycolytiques ainsi que les fonctions effectrices des TILs (48,49). En effet, il a été montré que lorsque PD-1 se lie à son ligand PD-L1, cela entraîne des changements métaboliques au sein des TILs vers l'oxydation des acides gras au dépend de la voie de la glycolyse. Cet état métabolique est similaire à celui des

lymphocytes T mémoire et des Tregs immunosuppressives dont l'avantage est une élévation de la durée de vie cellulaire mais au dépend de sa fonction effectrice anti-tumorale (9).

Par ailleurs, il a également été constaté que l'immunothérapie anti-PD-1 avait une action en périphérie avec la prolifération de lymphocytes T CD8⁺PD-1⁺ dans le sang de patients atteints d'un mélanome ou d'un cancer du poumon (50,51). On ignorait encore récemment si les cellules T CD8⁺ en expansion provenaient de la périphérie ou étaient d'origine intra-tumoral. Cependant, l'équipe de Yost a constaté que la majorité des TILs possédait des TCR différents après traitement par anti-PD-1 par rapport à ceux retrouvés avant traitement (52), suggérant un recrutement de cellules T. Il a également été démontré qu'un nombre significatif de ces nouveaux lymphocytes spécifiques de la tumeur engagés par l'immunothérapie anti-PD-1 provenait du sang périphérique (52). Par conséquent, l'immunothérapie anti-PD-1 pourrait donc avoir un rôle de recrutement de nouvelles cellules T spécifiques de la tumeur à partir de la périphérie en plus du rôle d'amplification des TILs préexistants mais dont l'activation et l'épuisement chronique limitent significativement leur capacité de régénération (52,53). Une autre étude a identifié l'activation de clones de lymphocytes T CD8⁺ infiltrant la tumeur dans le sang périphérique d'un patient à la suite d'une immunothérapie anti-PD-1 (54). Yang a également montré que sur 10 clones principaux de cellules T infiltrant la tumeur, retrouvés chez des patients atteints d'un mélanome, ces derniers étaient facilement identifiables dans le sang après une immunothérapie anti-PD-1 (50). Ces données suggèrent la possibilité d'analyser les modifications induites par l'anti-PD-1 sur les cellules immunitaires indirectement à partir du sang périphérique du patient qui pourraient être le reflet des modifications en intra-tumorales.

VI] Rôle de la reprogrammation métabolique sur les populations immunitaires

Le récepteur PD-1 est également exprimé sur plusieurs cellules immunitaires telles que les cellules NK, NKT, les cellules B, les macrophages et certains sous-groupes de cellules dendritiques lors d'une réponse immunitaire (10). De même, il a été montré que lors de l'activation de ces différentes cellules immunitaires innées ou adaptatives, il existait également une reprogrammation métabolique, véritable support de la différenciation et de l'acquisition des fonctions cellulaires.

Tout d'abord, en ce qui concerne les macrophages, il en existe 2 types, les macrophages M1 qui sont importants pour la fonction cytotoxique, l'induction d'une réponse inflammatoire et la réponse aux dommages tissulaires. Ces macrophages consomment d'importante quantité de glucose avec libération de lactate et ont un taux de consommation d'oxygène bas en lien avec des altérations du cycle de Krebs (55–57). Il a été montré que lorsqu'on inhibait la glycolyse, cela conduisait à une diminution de la réponse inflammatoire avec une diminution de la sécrétion d'IL-1 β (58). Au contraire, les macrophages M2 utilisent principalement la voie de l'OXPPOS *via* la glutaminolyse pour assurer leur rôle anti-inflammatoire induisant une suppression de la réponse immune (55,56). Ainsi, le fonctionnement métabolique médie la polarisation des macrophages ainsi que leur fonctionnalité.

Une étude récente a mis en évidence que les cellules NK issus de sang humain présentaient une augmentation de leur activité glycolytique et oxydative de manière significative après stimulation par IL-2 (59). Par ailleurs, il a été décrit que la production d'IFN γ par les cellules NK était altérée en présence d'inhibiteurs de la glycolyse (59,60). L'activation des cellules NK nécessite donc une reprogrammation métabolique médiée par mTORC1 favorisant ainsi la glycolyse, permettant d'assurer

la synthèse d'IFN γ et l'expression de granzyme B nécessaire à leur fonction cytotoxique (61).

Pour les cellules dendritiques, la glycolyse est également importante lors de leur activation. En effet, elle est indispensable pour assurer la maturation, la migration et la phase de *priming* avec les cellules T. Il a été montré que l'inhibition de la glycolyse entraînait une réduction de l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 des cellules dendritiques et par conséquent impactait l'activation lymphocytaire T (58). En phase de quiescence, ces cellules utilisent préférentiellement la phosphorylation oxydative pour assurer leurs besoins bioénergétiques.

Pour les Tregs, lors de l'activation immunitaire, le signal reçu *via* les TLR stimule la voie PI3K-Akt-Mtorc1 activant la voie de la glycolyse afin d'assurer la prolifération cellulaire (62). Cependant, il a été montré que l'induction de la glycolyse et la surexpression de Glut-1 s'accompagnaient d'une diminution de l'expression de Foxp3 (FOrkhead boX P3) et d'une altération des capacités immunosuppressives des Tregs (63). En effet, lorsqu'on inhibe la glycolyse, on restaure les fonctions immunosuppressives des Tregs (62). Par ailleurs, il a été montré que Foxp3 s'oppose à la signalisation de PI3K-Akt-mTORC1 et vise à diminuer le métabolisme anabolique en faveur du métabolisme oxydatif indispensable à l'acquisition des fonctions régulatrices des Tregs (62–64). Le métabolisme des Tregs est donc un processus dynamique régulé par différents signaux tels que le signal du TCR, les cytokines et la disponibilité des éléments nutritifs déterminant l'expansion et l'acquisition des fonctions suppressives.

VII] Le métabolisme : potentiel biomarqueur et voie thérapeutique en Oncologie

Il est maintenant admis que le métabolisme joue un rôle clé dans la différenciation et l'acquisition des fonctions des cellules immunitaires. Actuellement, de nombreuses équipes travaillent à l'élaboration de combinaisons alliant des médicaments ciblant le métabolisme avec des inhibiteurs de point de contrôle ou le transfert adoptif de cellules T métaboliquement pré-conditionnées afin d'avoir une action synergique dans le but d'améliorer l'efficacité thérapeutique. A l'heure actuelle, la différence de réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 des patients atteints d'un mélanome métastatique, liée aux propriétés intrinsèques de la tumeur et à celles du système immunitaire, est encore du domaine de la recherche. Malheureusement, à ce jour, il n'existe aucun biomarqueur prédictif de la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 dans le mélanome. Il s'agit pourtant d'un élément crucial qui éviterait l'introduction d'une immunothérapie anti-PD-1 chez les patients non-répondeurs évitant ainsi les effets indésirables parfois sévères du traitement, permettant d'instaurer d'autres stratégies thérapeutiques et réduisant les coûts liés à la santé.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Il s'agit d'une étude translationnelle et prospective réalisée chez des patients atteints d'un mélanome métastatique et traités en première ligne par immunothérapie anti-PD-1 dans le service de Dermatologie du Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Lille du 1^{er} mars 2018 au 1^{er} mars 2019.

Les objectifs principaux de l'étude sont d'évaluer les modifications précoces suivant une cure d'immunothérapie anti-PD-1:

- (i) Du phénotype et de la fonctionnalité des *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) circulants
- (ii) Du métabolisme mitochondrial et énergétique des PBMCs circulants

Ces données seront corrélées à l'évolution clinique à 6 mois des patients dans le but d'identifier un ou plusieurs marqueurs prédictifs de la réponse anti-tumorale.

Les analyses ont été réalisées au sein de l'UMR 8161 – *Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies* à l'Institut de Biologie de Lille dirigé par le Professeur Delhem en collaboration avec l'équipe du Professeur Marchetti au sein de l'UMR-S-1172 au Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert.

Ce travail a fait l'objet d'un article en cours de publication et inclus ci-dessous.

ARTICLE

Early Modification of the OCR/ECAR ratio under Anti-PD-1 Immunotherapy: A Potential Predictive Markers of PD-1 Response in Metastatic Melanoma

M. Lamiaux^{(1)*}, P. Corazao^{(1)*}, O. Moralès^(2,3,4), S. Magne⁽¹⁾, C. Milhem^(2,3,4), V. Dziwniel⁽⁵⁾, O. Ernst⁽⁶⁾, J. Kluza⁽⁷⁾, P. Marchetti⁽⁷⁾, L. Mortier^{(1)*} and N. Delhem^{(2,3,4)*}

(1) Department of Dermatology, Claude Huriez hospital, CHU Lille, France

(2) CNRS UMR 8161, IRCV laboratory, F-59000Lille, France

(3) Univ. Lille, UMR 8161 – M3T – Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille, France

(4) Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

(5) Modern Languages Department, F-Villeneuve d'Ascq, France

(6) Department of Radiology, Claude Huriez hospital, CHU Lille, France

(7) Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172 - JPArc - Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France

* Equally contributed authors

ABSTRACT

Since 2011, the treatment of metastatic melanoma has undergone a revolution with the introduction of anti-immune checkpoints. Unfortunately 60 to 70% of patients show innate or acquired resistance to anti-PD-1. At present, no predictive biomarker exists to determine the response to this treatment early.

We identified early changes in OCR / ECAR ratio of cellular metabolism, as early as one cycle of anti-PD-1, on PBMCs of patients with metastatic melanoma. At 3 weeks of anti-PD-1, we also found an early rise in reserve respiratory capacity in patients with a clinical response to 6 months of RECIST-based immunotherapy while non-patients responders or disease stability at 6 months showed no change in spare capacity. Finally, we show a significant linear correlation between OCR / ECAR ratio changes and the tumor response at 6 months ($p = 0.045$).

The evaluation of the OCR / ECAR ratio from PBMCs of patients could be used as a potential marker for early response to anti-PD-1 immunotherapy and can easily be performed in clinical practice. In the event of validation of these data, this would allow rapid therapeutic adaptation in non-responder patients and could increase the chances of survival by rapid therapeutic reassessment. It would also help in the evaluation of new therapeutic protocols such as combinations or

sequential treatments in melanoma, or even be used in the evaluation of other types of cancers treated with anti-PD-1.

INTRODUCTION

Immune checkpoint inhibitors have revolutionized the prognosis of metastatic melanoma. Currently, anti-PD-1 immunotherapy is offered as a first line treatment, alone or in combination. Unfortunately, only 30 to 40% of patients initially respond to treatment and some develop acquired resistance (1). To date, there is no biomarker that predicts the response to PD-1 immunotherapy in melanoma. However, this is a crucial element that would avoid introducing inappropriate treatment for the patient, especially since anti-PD-1 immunotherapy sometimes presents severe toxicities. This time saving and efficiency in therapeutic care would also have positive impacts on health costs.

The anti-PD-1 immunotherapy targets the inhibitory synapse between cancer cells expressing PDL-1 and T cells expressing the co-inhibitor PD-1 receptor in order to restore an anti-tumor response. It has been shown that the differentiation of T cells and the acquisition of their effector function depend on their ability to reprogram their metabolism. Indeed, following an activating signal, the T cell will acquire anabolic metabolism to ensure cell proliferation and cytokine production through aerobic glycolysis (Warburg effect) allowing a rapid supply of ATP (2–4). In the tumor microenvironment, effector T cells will therefore compete with cancer cells for the same nutrient which is glucose (3,5). In addition, T cells chronically exposed to tumor antigens will overexpress PD-1 as well as other inhibitory receptors inducing an "exhausted" state (6). The PD-1 inhibitors can reverse this dysfunctional state.

Indeed, it has been demonstrated in experimental studies that anti-PD-1 increases the glycolytic capacities and effective functions of TILs (5,7,8). However, this effect is dependent on the level of expression of PD-1 in T cells. In case of high PD-1 expression, metabolic alterations are too pronounced and the high oxidative stress will prevent the resumption of anabolic activity and block the effective capacities of T cells even in case of PD-1 inhibition (9). PD-1 appears to be a key marker of the metabolic state of T cells and therefore reflects their functional capacity. It is also expressed on several immune cells such as natural killer cells (NK), NKT cells, B cells, macrophages and some dendritic cell subgroups during immune activation (10). An increase in glycolysis has also been demonstrated when these different types of immune cells are activated (11–15). It is therefore a hallmark in metabolic change during immune cells activation process and a true vector of the effector immune response. Recent studies have shown a correlation between the phenotypic changes of circulating T cells and the response to anti-PD-1 immunotherapy (16). Moreover, during treatment with anti-PD-1, the tumor infiltrating lymphocytes presents other clones than those found before treatment, indicating a recruitment from peripheral blood (17). Few studies have been based on the search for predictive factors on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); this is an easily achievable and renewable gesture during treatment in clinical practice with simple and fast laboratory techniques. Therefore, we wanted to evaluate the early modifications of inhibitors of the PD-1 pathway on the immune and metabolic profile of PBMCs in patients with metastatic melanoma in order to detect a predictive marker of the anti-tumor response.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patients

This monocentric and prospective clinical trial NCT02828202 started in March 2018 in the dermatology department of Lille University Hospital. Eligible patients were 18 years old or older, had unresectable stage III or IV melanoma treated with first-line PD-1 immunotherapy. Patients participating in the protocol gave their written permission for the use of their clinical data in this study. This study was the subject of an amendment from the Melbase project and obtained a favorable opinion from the committee for the protection of persons (**Annexe 2**).

Human whole blood samples were collected in 3 tubes of 8 mL containing sodium heparin in order to isolate and analyze PBMCs before initiation of treatment (T0) and then at three weeks (T1), 3 months (T2), 6 months (T3) and 1 year (T4) after the start of treatment (**Fig.1A**). The administrations of immunotherapy (nivolumab 3mg/kg every 2 weeks or pembrolizumab 2mg/kg every 3 weeks) as well as clinic morphological evaluations (*Computerized Tomography-scan/CT-scan* and brain *Magnetic Resonance Imaging/MRI* every 3 months) were carried out according to the recommendations of the High Authority of Health.

Flow Cytometry Assays

The blood was diluted half in Phosphate Buffered Salin (PBS) without Ca²⁺ nor Mg²⁺ (PBS⁻) (Gibco, LifeTechnologies, France) and then separated on a gradient of

lymphocyte separation medium (MSL) (Eurobio, France) by centrifugation at room temperature (RT) and without brake. The PBMC ring was then recovered and washed twice in PBS before manual cell counting on Thoma cells under an inverted microscope (Eclipse TS100, Nikon). The viability of the cells was verified by the use of Trypan blue (Gibco). The cell suspension was incubated for 10 minutes at RT, and protected from light, with human FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, France). Fresh PBMCs were then incubated for 15 minutes at RT and stained with fluorescence-conjugated antihuman monoclonal antibodies (Miltenyi Biotec, Berlin, Germany):

- T cells markers: CD3 [phycoerythrin (PE)-Vio770], CD4 [VioBlue], CD8 [VioGreen] ;
- Immune activation markers: CD25 [VioBright-FITC], CD69 [PE Vio 770], CCR7 [PE] ;
- Inducible regulatory T cells markers: CD4 [VioBlue], CD18 [FITC], CD49b [PE-Vio770].

The use of control isotypes made it possible to dispense of cellular autofluorescence. The analysis was carried out on living cells by using of a fluorescent *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA): 7-aminoactinomycin D (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, France) with the flow cytometer Canto II (BD Biosciences, France). Data acquisition was done using Diva software and these data were analyzed using the FlowJo software (BICEL Cellular Imaging Platform).

Seahorse Metabolic Assays

75 000 cells were seeded per well with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific) with 20% glucose, 2 mM L-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate then deposited in the plate (FluxPaks, Agilent Seahorse XF24 kit) previously coated at Cell-tak (Corning, USA). Two successive centrifugations were carried out (1min, 450 Revolutions Per Minute (RPM) then reversal of the plate and recovery 1min, at 650RPM, at RT). In vitro oxygen consumption and extracellular acidification rates were measured with the Seahorse XFe96 Analyzer. First, three basal Oxygen consumption rate (OCR) and *Extracellular Acidification Rate* (ECAR) measurements (3-0-3 mix-wait-measure cycle) were performed. Next, Oligomycin (Sigma Aldrich) at 1 μ M was injected. Then, first injection of Carbonyl Cyanide-4-Phenylhydrazone/FCCP (Sigma Aldrich) at 0.55 μ M was performed followed by a second FCCP injection at the final concentration of 1.16 μ M. Finally, an injection combining 100 μ M rotenone and 1.0 μ M antimycin A was introduced. 2 measurements were performed after each injection.

Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)

The sandwich ELISA test was used to quantify cytokine concentrations related to the Th1 (IL-2, IFN γ) and immunosuppression (IL-10, TGF β /*Transforming Growth Factor Beta*) response. ELISA kits for detecting each cytokine were obtained from BD (BD Pharmingen TM, USA). The assays were made in triplicate with serum sample added to each well according to the manufacturer's instructions. On each plate, an 11-point standard range by half-training of the recombinant cytokine (BD Pharmingen

™, USA) with a maximum concentration of 2500 µg/ml was performed. The readings were made at 492 nm with the spectrophotometer (Multiskan EX, ThermoLabsystems, France). Analyzes were obtained by Ascent™ Software (TheroLabsystems, France) and protein concentrations were expressed in pg/mL.

Statistical analysis

We used Student's T-Test to evaluate the correlation coefficient between the OCR/ECAR ratio of PBMCs of patients following one cycle of anti-PD-1 and the 6-month tumor response of immunotherapy according to RECIST criteria version 1.1 (**Annexe 3**). Statistical significance was defined as $P < 0.05$. All analyzes were performed using Prism® (version 8.0, GraphPad Software, Inc).

RESULTS

Patient characteristics

Five patients were enrolled between 3/2018 and 03/2019 at the Dermatology Clinic of Lille University and Hospital Center (**Fig.1B**). All patients provided a written informed consent. The average age was 65.2 years and the sex ratio was 3: 2 (3 women and 2 men). Four patients had cutaneous melanoma (2 *Superficial Spreading Melanoma/SSM* and 2 nodular) and for one patient the primitive was unknown. All patients had advanced metastatic melanoma with 4 M1c or M1d stage patients. All patients received first-line immunotherapy with anti-PD-1, four patients were under pembrolizumab and one patient was under nivolumab.

Biological characteristics

For serum markers (**Fig.1C**), C-Reactive Protein (CRP) was elevated to 105 mg/L (standard < 5 mg/L) at T0 for P2 and returned to a subnormal value at T1. There was mild initial lymphopenia in 3 patients (P1, P3, P5) with near normalization at T1. P1 and P2 had a high initial monocyte level (highest norm at 710/mm³). At T1, this rise was accentuated for P1 while the monocyte level was normalized for P2. The initial Lactate Deshydrogenase (LDH) level was high for P2, P4 and P5. This rate was normalized for P2 and P4 at T1, whereas for P1 and P5, there were increases at 3 weeks of the beginning of immunotherapy.

Early modification of immune monitoring following the introduction of anti-PD-1 immunotherapy

We were interested in the results of P1 and P2, which had an opposite response profile under anti-PD-1 immunotherapy, one with tumor progression (P1) and the other with a complete response (P2). Other patients had different responses under anti-PD-1: patient 4 (P4) has disease stability at 6 months; patient 3 (P3) has also a complete response while patient 5 (P5) has tumor progression at 6 months (the results are presented in the supplementary figures). When we look at the frequency of the initial lymphocyte populations we see that they represent 40% of PBMCs in P1 and are predominantly represented by CD4⁺ T cells (**Fig.2A**). At T0, P2 had a larger lymphocyte population corresponding to half of the PBMCs. In addition, the distribution of CD4⁺ T cells relative to CD8⁺ T is generally homogeneous (28.94% and 22.15% respectively) (**Fig.2B**). At T1, after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy, we observed really important differences in immune population profiles between P1 and P2. Indeed, P1 showed a clear decrease of almost half of its lymphocyte population (20.5% versus 40.7%), in particular CD3⁺CD4⁺ (13.28% versus 29.75%) (**Fig.2A**). In contrast, P2 had a moderate rise in all its CD3⁺ lymphocyte populations (62.9% versus 51.5%) (**Fig.2B**). These data also seem to be confirmed in other patients. Indeed, P3 had a large initial proportion of lymphocytes in PBMCs unlike P4 and P5 (**Supplementary Figure 5**).

When we look at the activation profile of T cells, we note that P1 after a cycle of anti-PD-1 immunotherapy had a global stability of early activation markers (CD25 and CD69) and late (CCR7) compared to the time before treatment (**Fig.2C**), while P2 showed an elevation of the early activation marker (CD25) after one anti-PD-1 cycle with stability of the other markers (CCR7 and CD69) (**Fig.2D**). Thus, early

changes appeared from an immunotherapy course to a lymphocyte activation profile for P2 compared to P1, which did not show any changes in activation markers. According to the results of P3, P4 and P5 (**Supplementary Figure 5**), there were also be differences in terms of lymphocyte proportion within PBMCs and expansion capacity after a cycle of anti-PD-1. However, there is no evidence of correlation between the modification in the expression of lymphocyte activation markers and the tumor response after one cycle of immunotherapy.

In the analysis of the cytokine profile, it was noted that for P1 the serum concentration of TGF β increased strongly by a factor of 4 after one cycle of immunotherapy (T0: 692, 69 $\mu\text{g/ml}$, T1: 3740.31 $\mu\text{g/ml}$) associated with a moderate decrease in effector cytokines INF γ (T0: 85.36 $\mu\text{g/ml}$, T1: 73.73 $\mu\text{g/ml}$) and IL-2 (T0: 1652.10 $\mu\text{g/ml}$, T1: 1118.20 $\mu\text{g/ml}$) (**Fig2.E**). IL-10 was stable with a concentration of 11.04 $\mu\text{g/ml}$ before and 16.46 $\mu\text{g/ml}$ after treatment (**Fig2.E**), while P2 showed a decrease in the serum TGF β concentration between T0 and T1 from 1544.38 $\mu\text{g/ml}$ to 1077.61 $\mu\text{g/ml}$ (**Fig2.F**). For the IFN γ , IL-2 and IL-10 cytokines, no clear change in serum concentration was observed before and after one cycle of anti-PD-1 (**Fig2.F**). The secretome analyzes of the other three patients (P3, P4 and P5) failed to demonstrate a cytokine profile related to the response to anti-PD-1 immunotherapy (**Supplementary Figure 6**).

Changes in the frequency of lymphocyte populations and cell activation status were observed after a single course of anti-PD-1 immunotherapy for P2 with an immunostimulatory effect. However, no early modification of IFN γ , immunostimulatory cytokine secretion was observed in this patient. For P1, the first course of immunotherapy did not seem to restore an immune response. On the contrary, P1

presented a decrease of lymphocyte T populations, no increase in lymphocyte activation markers and an elevation of the immunosuppressive cytokine TGF β .

Modification of the metabolic profile of immune populations under anti-PD-1 immunotherapy

We performed a metabolic assessment on PBMCs of patients before and after a cycle of anti-PD-1 immunotherapy. We measured the OCR which is a reflection of the activity of oxidative phosphorylation as well as the ECAR representing the glycolytic flux. For P1, there was a slight improvement in the OCR response to FCCP with no change kinetic ECAR response to oligomycin between T0 and T1 (**Fig.3A and B**). There was a significant increase of 16.64% in basal OCR after one cycle of immunotherapy, with an average basal rate of 235,17 pmol.min⁻¹ at T0 against 282,11 pmol.min⁻¹ at T1 (**Fig.3C**). The maximum respiratory capacity for P1 showed no significant change before and after one cycle of anti-PD-1 (T0: 574,90 pmol.min⁻¹; T1:634,62 pmol.min⁻¹) as well as spare respiratory capacity (T0: 321,35 pmol.min⁻¹; T1: 352,51) (**Fig.3K and L**). On the opposite, the basal rate of ECAR showed a significant decrease of 41.2% with an average basal rate of 58,18 mpH.min⁻¹ at T0 against 34,21 mpH.min⁻¹ at T1 (**Fig.3D**). Thus, OCR/ECAR ratio showed a significant increase with a rate twice as high between T1 and T0 suggesting a trend towards oxidative phosphorylation (**Fig.3E**).

On the contrary, P2 showed a marked increase of the kinetic ECAR response with a slight increase in the OCR response to FCCP at T1 compared to the T0 (**Fig.3F and G**). The maximum respiratory capacity for P2 was globally stable between T0 and T1 (520,84 pmol.min⁻¹ and 595,42 pmol.min⁻¹ respectively) (**Fig.3M**), while the spare capacity showed a significant increase after one cycle of anti-PD-1 (T0: 215.88

pmol.min⁻¹, T1: 569.55 pmol.min⁻¹) (**Fig.3N**). There was a slight but significant decrease in the basal OCR rate of 5.73%, with an average basal rate of 274.46 pmol.min⁻¹ at T0 against 258.73 pmol.min⁻¹ at T1 (**Fig.3H**). Basal ECAR was significant increased by 56.33% with an average basal rate of 29,04 mpH.min⁻¹ at T0 against 66,50 mpH.min⁻¹ at T1 (**Fig.3I**). The OCR/ECAR ratio showed a significant decrease of 58.92% after a single immunotherapy cycle (**Fig.3J**). Thus, it appears that the PBMCs of P2 modified their metabolic program after a single cycle of immunotherapy in favor of glycolysis while maintaining an oxidative phosphorylation activity, which corresponds to an immune activation profile. PBMCs of P1 maintained oxidative phosphorylation as the main bioenergetic source. Immune cells did not engage the glycolysis pathway after one cycle of anti-PD-1 which corresponds to the main pathway of metabolism in case of immune activation. Thus, it appears that PBMCs of P2 had metabolic changes necessary for cell activation and effector function acquisition whereas PBMCs of P1 did not show a metabolic change following a single cycle of anti-PD-1.

The results of P2 are very interesting because they are similar to those of P3 with a decrease in the OCR/ECAR ratio and a marked increase in the spare respiratory capacity after a cycle of anti-PD-1 and which also presented a tumor response at 6 months (**Supplementary Figure 7**). Both P5 and P1 showed a significant increase in OCR/ECAR ratio and a decrease in spare respiratory capacity, and both showed tumor progression at 6 months of immunotherapy (**Supplementary Figure 7**). Finally, the profile of P4, which had disease stability at 6 months, showed a decrease in the OCR/ECAR ratio after a cycle of anti-PD-1 but kept a stable reserve respiratory capacity after immunotherapy (**Supplementary Figure 7**).

OCR/ECAR ratio correlates with anti-tumor response

A CT-scan evaluating the response under immunotherapy was performed at 3 months and 6 months after the initiation of treatment. The response was determined according to the criteria RECIST version 1.1 (**Annexe 3**). As early as 3 months, P1 showed tumor progression with a 40% increase in tumor volume (**Fig.4C**). At 6 months, tumor progression worsened with a tumor gain of 60% (**Fig.4A and C**), whereas for P2, there was tumor stability at 3 months with a decrease in tumor volume of 20% (**Fig.4D**). The evolution of P2 at 6 months was favorable with a partial response and a loss of tumor volume of 30% (**Fig.4B and D**). Finally, there appears to be a linear and significant correlation between OCR/ECAR changes from PBMCs after one immunotherapy cycle and the best tumor response at 6 months in our patients with metastatic melanoma ($p= 0.0455$) (**Fig.4E**). It appears that early changes in immune cell metabolism following a single cycle of anti-PD-1 immunotherapy may correlate with the anti-tumor response under immunotherapy.

DISCUSSION

We showed an early change in the frequency of peripheral lymphocyte populations after only one cycle of anti-PD-1 immunotherapy. Indeed, patients with stability or partial response under anti-PD-1 showed an increase in the frequency of CD3⁺ populations as well as double populations labeled CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺, while the progressing patients showed a stability or decrease of CD3⁺ populations in one cycle of anti-PD-1 immunotherapy. It has been shown that the majority of tumor-specific TILs after anti-PD-1 treatment had unidentified TCRs before treatment,

suggesting that they were newly recruited and therefore detectable in peripheral blood (53). Indeed, it has also been shown in studies that anti-PD-1 may modify the peripheral blood immune populations, in particular by revitalizing the CD4⁺ and CD8⁺ T cell lymphocytes, in particular with a "memory" or "central memory" phenotype (19).

When we look at the changes in the secretome, we notice that the patients with a partial response maintained a stable serum concentration of IFN γ whereas the concentration of TGF β decreased after one cycle of anti-PD-1, which is rather in favor of an effector immune response. On the contrary, patients with progression or stability showed a decrease in their serum concentration of IFN γ and a high concentration of TGF β after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy revealing an immunosuppressive response. One team has shown that IFN γ can lead to the expression of several genes necessary but not sufficient for the clinical response under anti-PD-1 (20). In addition, TGF β can be secreted by melanoma cells to escape the immune system and promote cancer progression (21). This modification does not apply to Patient 5 who, despite tumor progression, showed an increase in serum concentration of IFN γ and an almost nil rate of TGF β after one cycle of immunotherapy. This can be explained by the paradoxical role of IFN γ , which is able to directly upregulate PD-L1 and PD-L2 ligands in tumor cells (22), immune cells stromal cells and even on tumor exosomes (23), thus promoting the inhibitory synapse with PD-1 expressed on T cells infiltrating the tumor resulting in a downregulation of the cytotoxic response and called feedback loop. LDH is known to be a serum marker correlated with overall patient survival but not with response to treatment (24). Other studies have shown that serum cytokine levels may correlate with responses to immune control inhibitors such as IL-8 in melanoma (25). It has also been shown that the initial levels of IFN γ , IL-6 and IL-10 are higher in non-

responders to nivolumab (26). However, currently, no cytokine biomarker is used and validated in routine practice to predict the response to anti-PD-1. We found no predictive markers of cytokine response to anti-PD-1 immunotherapy in our cohort, although its size is reduced, consistent with the literature results.

We have demonstrated a significant increase in reserve capacity from one anti-PD-1 immunotherapy cycle in patients with partial response to non-responder patients. The spare respiratory capacity corresponds to the difference between basal respiration rate and maximal respiration rate; it makes it possible to measure the increase in cellular respiration after contact with various inhibitors such as oligomycin and FCCP. It is a marker essential to the bioenergetic of the cell that is more sensitive than the maximum respiratory capacity to evaluate the metabolic capacity of the cell to meet additional energy needs related to different stress. It has been shown that the higher the spare capacity, the better the cell survival in hypoxia (27). It has been shown that the effector function of T cells is sustained over the long term in chronic diseases such as cancer by mitochondrial activity. It seems that it is the persistent activation of the Akt intracellular signal by the tumor microenvironment which would be responsible for the repression of OXPHOS within the T lymphocytes causing a decrease in the reserve respiratory capacity (28). Thus, the T lymphocyte is no longer able to adapt to different stresses and is no longer able to respond even after stimulation with an anti-PD-1 due to a lack of energy resources. We therefore showed that there was a significant increase in the reserve respiratory capacity of PBMCs in patients with a response to anti-PD-1 immunotherapy. Thus, it demonstrates the early ability of immune cells to respond to stimulation by the immune checkpoints inhibitor and correlated with the clinical anti-tumor response evaluated at 6 months.

We identified in the 5 patients an early and linear correlation between the OCR/ECAR ratio measured on the PBMCs before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy and the best tumor response obtained under treatment. It has been shown during an acute infection that alterations in T cell bioenergetics occur early with reduced glucose utilization despite activation of the anabolic pathways. This metabolic dysfunction is related to the PD-1 signaling pathway (9). When antigenic stimulation becomes chronic (cancer/infection), PD-1 expression is higher on T cells associated with an established exhausted phenotype. It has been shown in this situation that inhibition of PD-1 does not restore the metabolic pathways of the cell linked to the accumulation of other factors. The cell is thus maintained in an irreversible dysfunction state (29,30). Otherwise, the Yost team found that the majority of TILs had different TCRs after anti-PD-1 treatment compared to those found before treatment suggesting T cell recruitment (31). It has also been shown that a significant number of these new tumor-specific lymphocytes engaged by anti-PD-1 immunotherapy came from peripheral blood (17,31). Therefore, anti-PD-1 immunotherapy would rather have a role in recruitment of new tumor-specific T cells than a role of amplifying the effector capacity of pre-existing TILs whose activation and chronic exhaustion significantly limit their regenerative capacity. Indeed, it has been shown that the ability of anti-PD-1 immunotherapy to restore peripheral blood CD8⁺ T cell function to the patient's tumor burden could predict the clinical response to immunotherapy (16).

Thanks to the Seahorse extracellular flux analyzer technique it is possible to measure the activity of glycolysis and oxidative phosphorylation in real time and to evaluate the bioenergetics of PBMCs before and after treatment. We have shown that the lower the OCR/ECAR ratio, the more it reflects anabolic metabolism of the

immune cells supporting their effector function. We can evaluate early, after a single cycle of anti-PD-1 immunotherapy, the ability of the latter to invigorate the immune populations and induce an anti-tumor response. Thus, there appears to be a linear correlation between changes in PBMC metabolism, including the induction of anabolic metabolism that is correlated with an anti-tumor response. Consequently, the difference in response to anti-PD-1 immunotherapy among patients could therefore be explained by the ability of immune cells to reprogram their metabolism. Indeed, at an advanced stage of exhaustion, the cells are no longer able to meet their bioenergetic need and the important metabolic stress suffered by the cell does not allow it despite stimulation by immunotherapy to restore its effector functions. Moreover, this technique would be easily achievable in clinical practice. Thus, performing this evaluation on a larger patient population could provide a threshold for the OCR/ECAR ratio that could determine the response to anti-PD-1 immunotherapy after only one cycle in metastatic melanoma. This study could also be applied in evaluating the response of melanoma to RAF and MEK-targeted therapies. In the event of validation of this predictive biomarker, these could be used in the evaluation of a new therapeutic protocol such as sequential therapy or combination of immunotherapy and targeted therapies in melanoma and on a larger scale, be applied in other cancers treated with anti-PD-1 immunotherapy.

FIGURES

Figure 1: Study procedure timeline and clinicobiological features of patients. Schedule of blood sampling times and CT evaluations for each patient following initiation of anti-PD-1 immunotherapy (A). Table of clinical characteristics of patients (B). Table of biological characteristics of patients (C).

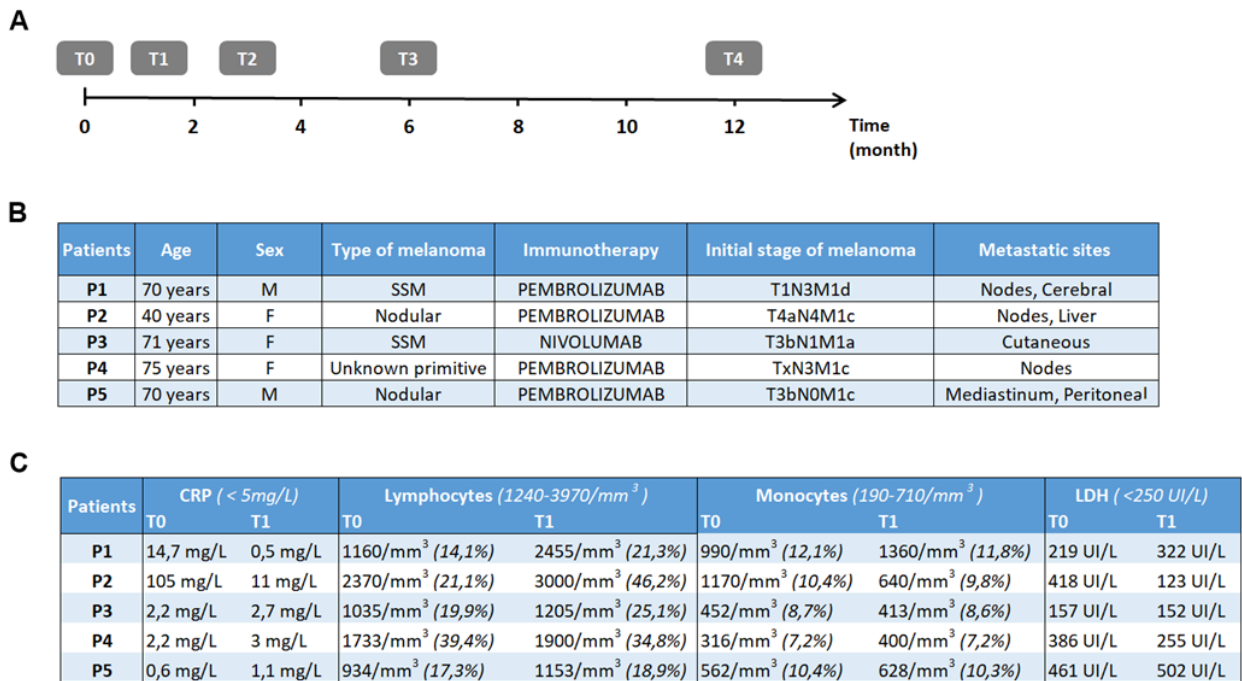


Figure 2: Immune and cytokine profile before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy. Flow cytometry data comparing the modification of lymphocyte populations between T0 and T1 in Patient 1 (A) and Patient 2 (B). Expression change of T cell activation markers before and after treatment of Patient 1 (C) and Patient 2 (D). Modification of the cytokine levels in serum of IFN γ , IL-2, IL-10 and TGF β by DAS-ELISA in Patient 1 (E) and Patient 2 (F).

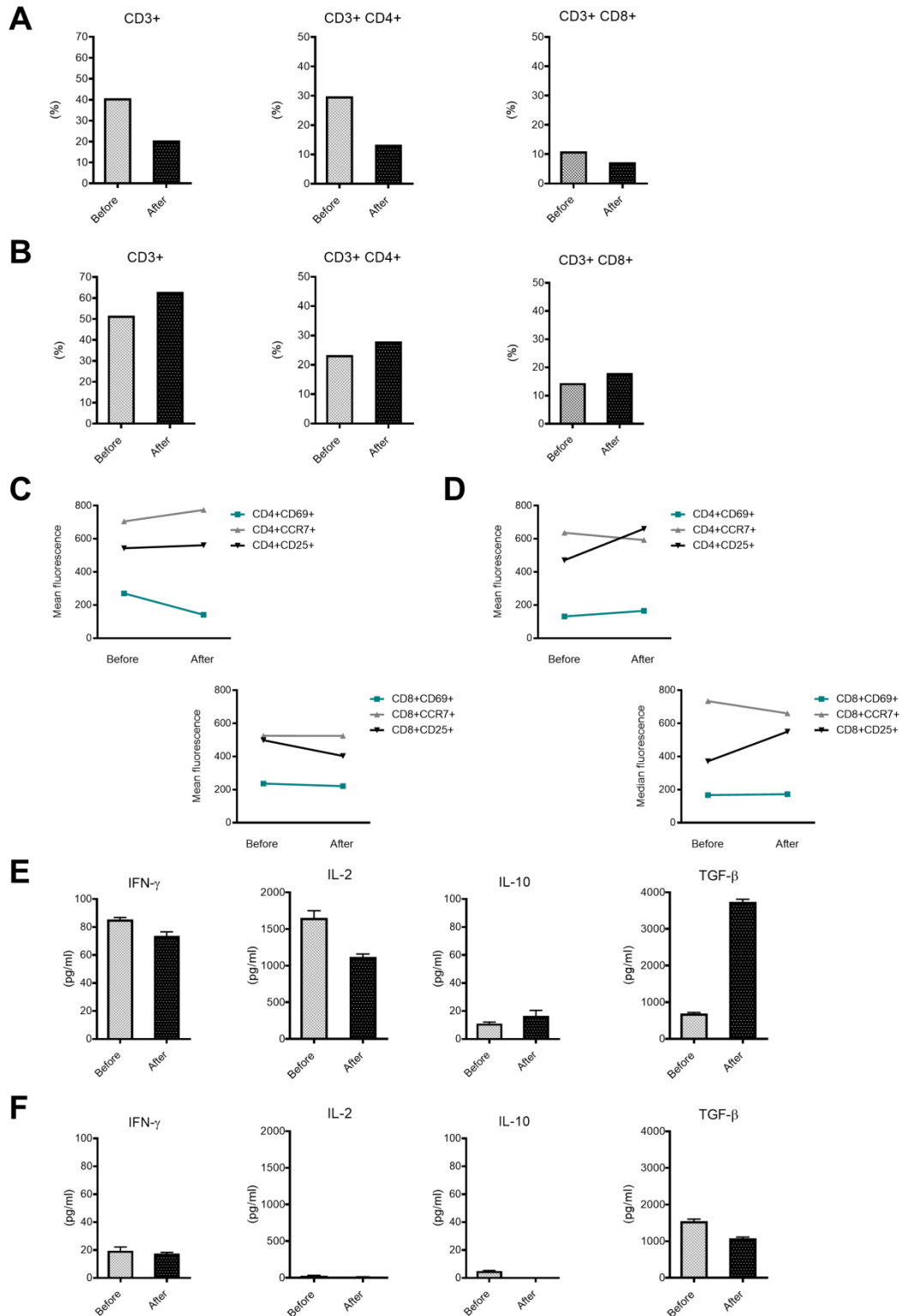


Figure 3: Analysis of the metabolic changes of immune populations before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy. Kinetic OCR response of PBMCs to oligomycin (1 μM), FCCP at low concentration (0,55 μM), FCCP at high concentration (1,16 μM) and rotenone/antimycin A (100 $\mu\text{M}/1 \mu\text{M}$) in Patient 1 (A and C) and Patient 2 (F and H). Kinetic ECAR response of PBMCs to oligomycin (1 μM), FCCP at low concentration (0,55 μM), FCCP at high concentration (1,16 μM) and rotenone/antimycin A (100 $\mu\text{M}/1 \mu\text{M}$) in Patient 1 (B and D) and Patient 2 (G and I). The OCR/ECAR ratio was calculated before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy for Patient 1 (E) and Patient 2 (J). Maximal respiratory capacity and spare capacity were calculated before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy for Patient 1 (K and L respectively). Maximal respiratory capacity and spare capacity were calculated before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy for Patient 2 (M and N respectively). The experiment was done in triplicate, each data representing mean \pm SD, *** $p < 0,0001$, $n=21$.

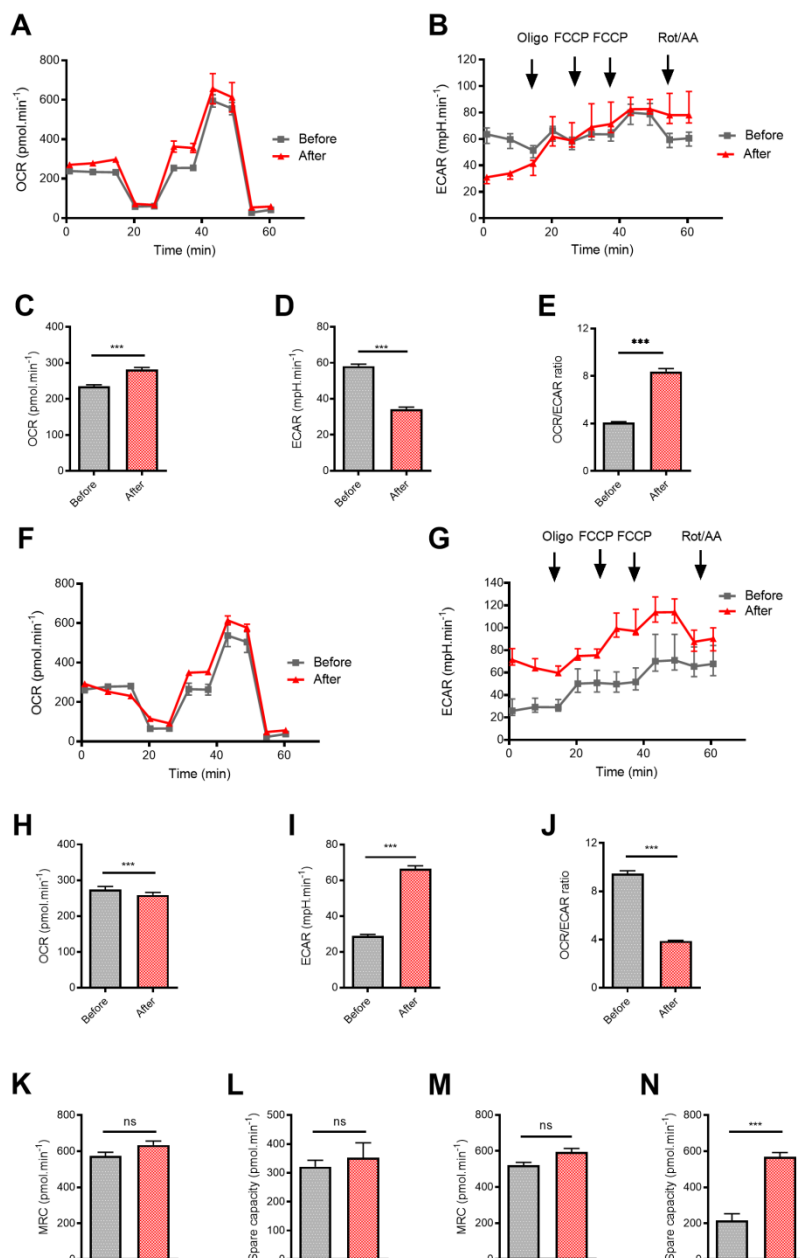
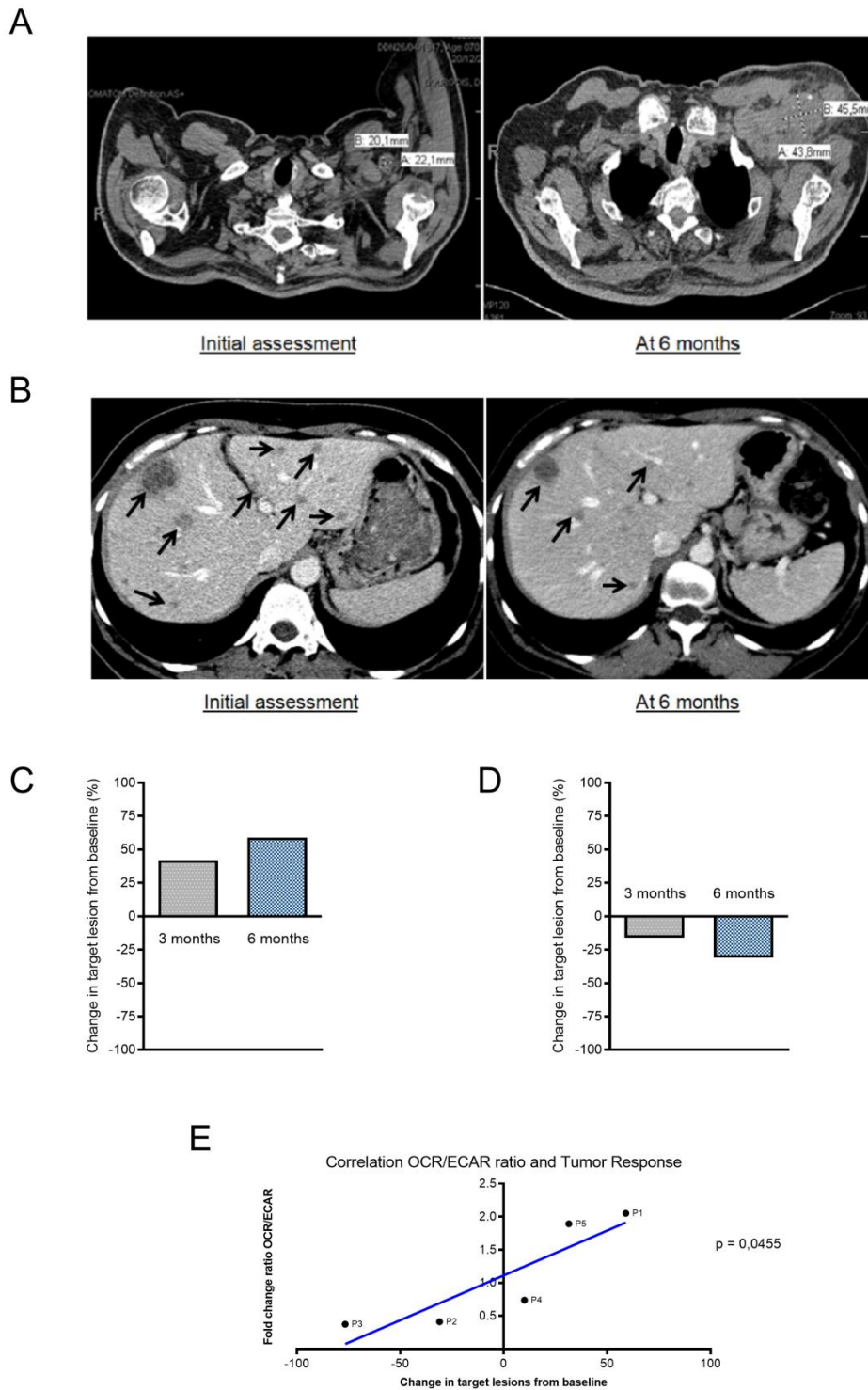


Figure 4: Analysis of the correlation between the evolution of the tumor response and the metabolic modifications of the immune populations under anti-PD-1 immunotherapy. CT-scan of tumor response from target lesions according to RECIST criteria version 1.1, initial assessment then at 3 months and 6 months of onset of anti-PD-1 immunotherapy, in Patient 1 (A and C) and Patient 2 (B and D). Results of regression analysis between fold change ratio OCR/ECAR at T0 and T1 and tumor response evolution with calculation of the linear correlation coefficient (E).



SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure 5: Frequency of lymphocyte populations and activation marker before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy. Flow cytometry data comparing the modification of lymphocyte populations in Patient 3 (P3), Patient 4 (P4), Patient 5 (P5) between T0 and T1 (A). Expression change of T cell activation markers of Patient 3 (P3), Patient 4 (P4) and Patient 5 (P5) before and after treatment (B).

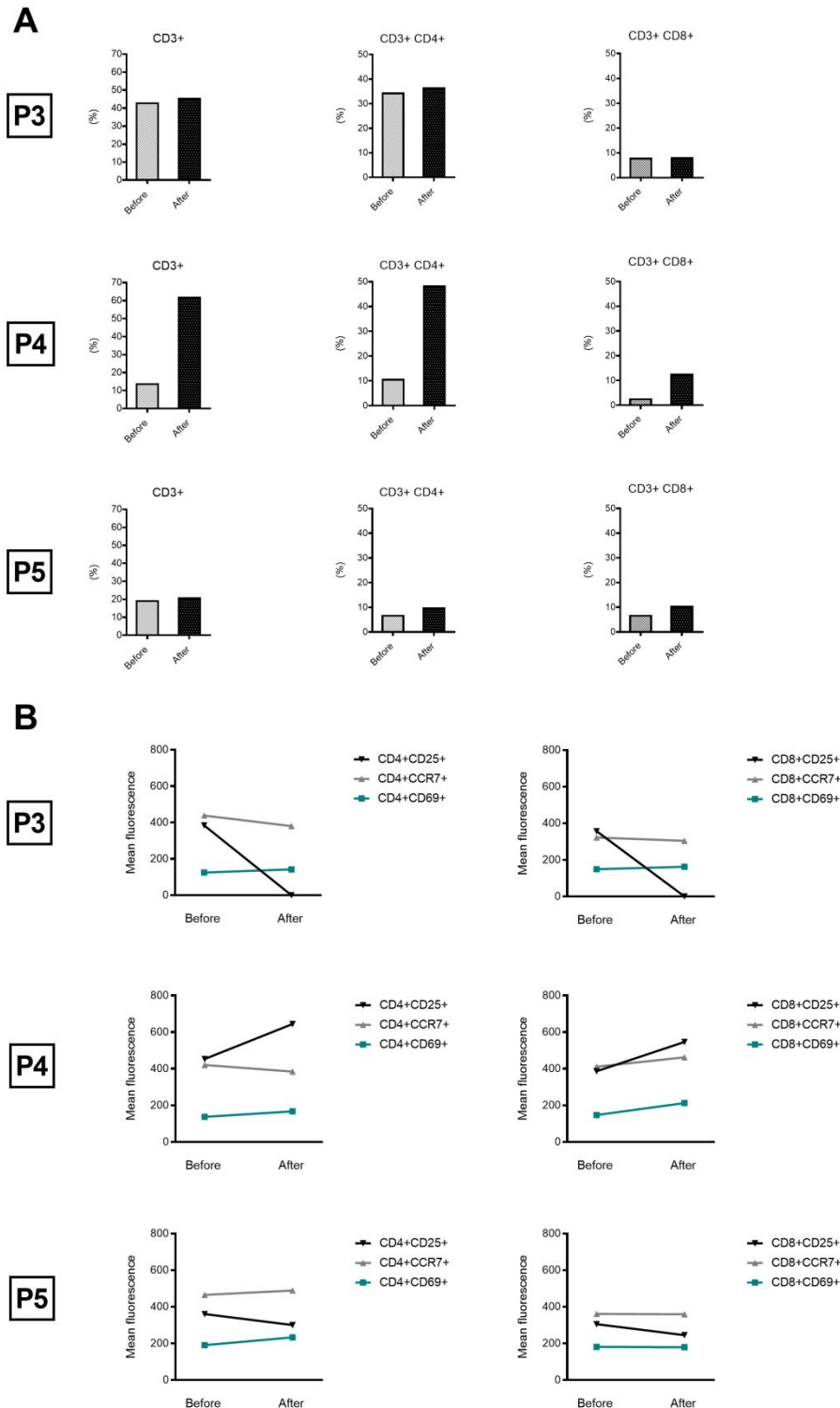


Figure 6: Cytokine profile before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy. Modification of the cytokine levels in serum of IFN γ , IL-2, IL-10 and TGF β by DAS-ELISA in Patient 3 (P3), Patient 4 (P4) and Patient 5 (P5).

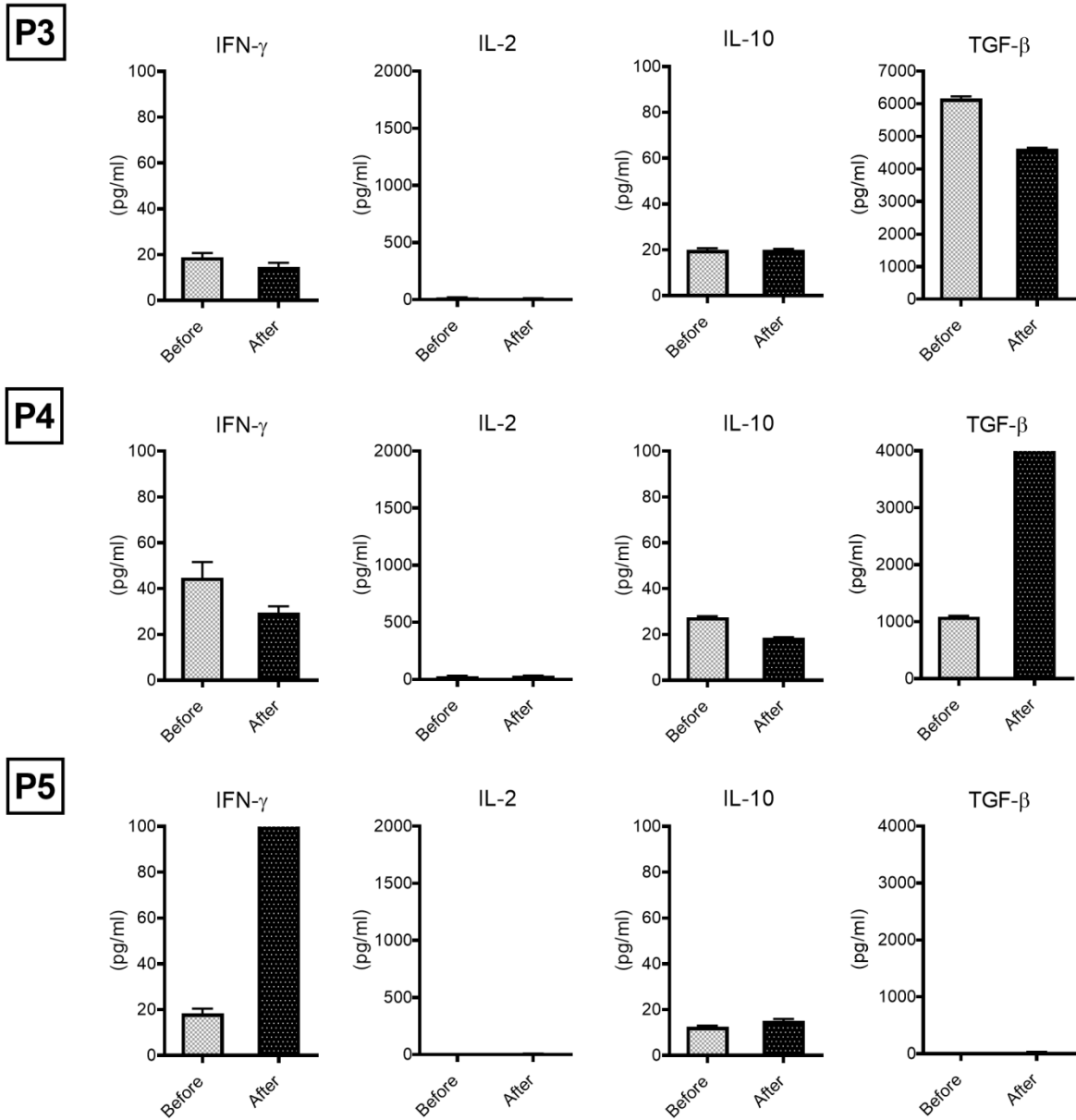
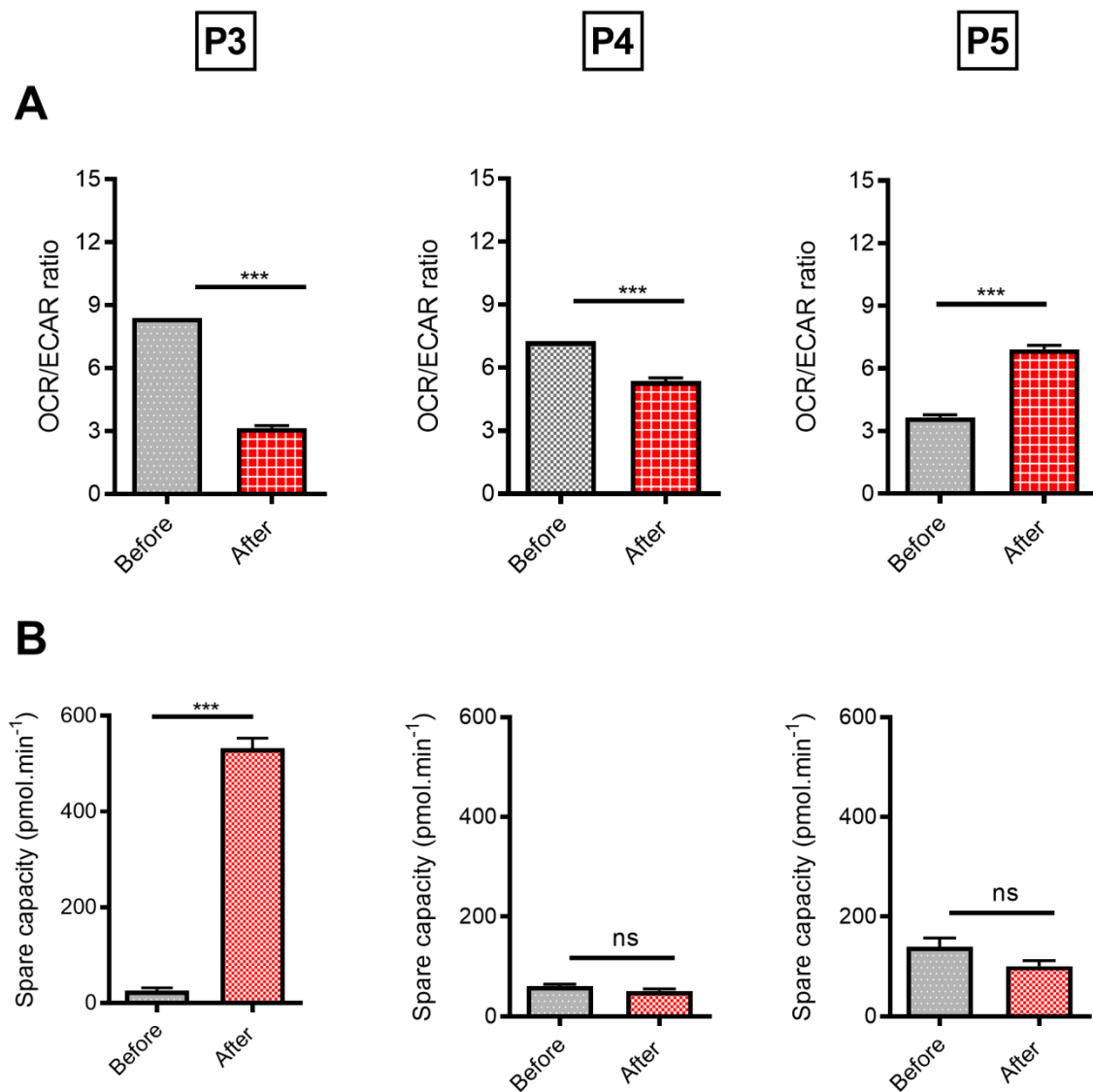


Figure 7: Analysis of the metabolic changes of immune populations before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy. The OCR/ECAR ratio was calculated for Patient 3 (P3), Patient 4 (P4) and Patient 5 (P5) before and after one cycle of anti-PD1 immunotherapy (A). Spare respiratory capacity was calculated for Patient 3 (P3), Patient 4 (P4) and Patient 5 (P5) before and after one cycle of anti-PD-1 immunotherapy (B). The experiment was done in triplicate, each data representing mean \pm SD, ***p < 0,0001, n=21.



BIBLIOGRAPHY

1. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 13 apr 2015;27(4):450-61.
2. Chang C-H, Curtis JD, Maggi LB, and al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*. 6 june 2013;153(6):1239-51.
3. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang C-H, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 11 oct 2013;342(6155):1242-454.
4. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell*. 09 2018;33(4):547-62.
5. Chang C-H, Qiu J, O'Sullivan D, and al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*. 10 sept 2015;162(6):1229-41.
6. Herbel C, Patsoukis N, Bardhan K, and al. Clinical significance of T cell metabolic reprogramming in cancer. *Clin Transl Med*. déc 2016;5(1):29.
7. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, and al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun*. nov 2015;6(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms7692>
8. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 avr 2016;22(8):1856-64.
9. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, and al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity*. 16 2016;45(2):358-73.
10. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity*. 17 2016;44(5):955-72.
11. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):553-65.
12. Rodríguez-Prados J-C, Través PG, Cuenca J, and al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 juill 2010;185(1):605-14.
13. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, and al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. 10 june 2010;115(23):4742-9.

14. Donnelly RP, Loftus RM, Keating SE, and al. mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 nov 2014;193(9):4477-84.
15. Doughty CA, Bleiman BF, Wagner DJ, and al. Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood*. 1 june 2006;107(11):4458-65.
16. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, and al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 04 2017;545(7652):60-5.
17. Callahan MK, Wolchok JD. Recruit or Reboot? How Does Anti-PD-1 Therapy Change Tumor-Infiltrating Lymphocytes? *Cancer Cell*. 16 sept 2019;36(3):215-7.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif*. dec 2001;25(4):402-8.
19. Yamaguchi K, Mishima K, Ohmura H, and al. Activation of central/effector memory T cells and T-helper 1 polarization in malignant melanoma patients treated with anti-programmed death-1 antibody. *Cancer Sci*. oct 2018;109(10):3032-42.
20. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, and al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 1 aug 2017;127(8):2930-40.
21. Yang Z, Qi Y, Lai N, and al. Notch1 signaling in melanoma cells promoted tumor-induced immunosuppression via upregulation of TGF- β 1. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 4 jan 2018;37(1):1.
22. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, and al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*. 09 2017;19(6):1189-201.
23. Chen G, Huang AC, Zhang W, and al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2018;560(7718):382-6.
24. Kagamu H, Yamaguchi O, Shiono A, and al. CD4⁺ T cells in PBMC to predict the outcome of anti-PD-1 therapy. *J Clin Oncol*. 20 may 2017;35(15_suppl):11525-11525.
25. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, and al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 aug 2017;28(8):1988-95.

-
26. Yamazaki N, Kiyohara Y, Uhara H, and al. Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Sci.* may 2017;108(5):1022-31.
 27. Pflieger J, He M, Abdellatif M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis.* 30 jul 2015;6:e1835.
 28. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, and al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity.* 16 2016;45(2):374-88.
 29. Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, and al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology.* june 2008;134(7):1927-37,1937.
 30. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, and al. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity.* 16 2016;45(2):389-401.
 31. Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, and al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat Med.* 2019;25(8):1251-9.

DISCUSSION

Nous avons montré un changement précoce de la fréquence des populations lymphocytaires du sang périphérique après une cure d'immunothérapie anti-PD-1. En effet, les patients présentant une stabilité ou une réponse partielle sous anti-PD-1 ont montré une augmentation de la fréquence des populations lymphocytaires CD3⁺ aussi bien les CD3⁺CD4⁺ que les CD3⁺CD8⁺ dès la première cure. Alors que les patients, résistants à l'immunothérapie anti-PD-1 et en progression tumorale à 6 mois, montraient soit une diminution soit une stabilité des populations lymphocytaires CD3⁺ après une cure d'anti-PD-1. Ces données sont intéressantes et pourraient constituer un potentiel marqueur prédictif de réponse aux anti-PD-1 mais reste à confirmer. Des études similaires ont été réalisées chez des patients atteints d'un mélanome ou d'un cancer de vessie et traités par immunothérapie anti-CTLA-4, il a également été montré un lien potentiel entre l'activation et l'expansion périphérique de lymphocytes T CD4⁺ et la réponse à l'immunothérapie cependant ces données sont à confirmer sur des effectifs plus importants (85,86).

Récemment, il a été mis en évidence que la majorité des TILs spécifiques à la tumeur, identifiés à partir de prélèvements sanguins de patients atteints de carcinomes cutanés, possédait des TCR différents avant et après immunothérapie anti-PD-1, suggérant qu'ils étaient nouvellement recrutés et donc détectables dans le sang périphérique (52,53). De même, l'équipe de Yamaguchi a également mis en évidence des modifications au sein des populations immunitaires du sang périphérique de patients atteints d'un mélanome et traités par immunothérapie anti-PD-1. Il a également montré que ces modifications apparaissaient dès le premier cycle d'immunothérapie avec l'expansion et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, en particulier ceux présentant un phénotype "mémoire" et "mémoire centrale" à l'origine d'une réponse immunitaire de type Th1 (74).

Cependant, lorsqu'on s'intéresse à l'analyse du sécrétome, nous montrons que les patients présentant une réponse partielle à l'anti-PD-1, conservent une concentration sérique stable en IFN γ et une diminution de la concentration en TGF β dès un cycle d'anti-PD-1, pouvant correspondre à un profil d'activation immunitaire. Alors que les patients en progression ou en stabilité présentent une diminution de la concentration sérique en IFN γ associée à une élévation de la concentration en TGF β suivant une cure d'anti-PD-1, évoquant plutôt une réponse immunosuppressive malgré la mise sous traitement. Il a été mis en évidence que l'IFN γ pouvait conduire à l'expression de plusieurs gènes nécessaires mais non suffisants à l'induction d'une réponse clinique aux anti-PD-1 (75). Par ailleurs, le TGF β est une cytokine immunosuppressive pouvant être directement sécrétée par les cellules de mélanome dans le but d'échapper au système immunitaire et ainsi favoriser la progression tumorale (76). Cependant ces constatations ne s'appliquent pas au patient 5 qui, malgré la progression tumorale, montre une augmentation de la concentration sérique en IFN γ associée à une faible concentration en TGF β suivant un cycle d'anti-PD-1. Par conséquent, les modifications de concentration des cytokines à partir du sang périphérique sont d'interprétation complexe et ne peuvent être utilisées comme marqueur prédictif de la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1. De plus, il a été montré que certaines cytokines pouvaient parfois avoir un rôle paradoxal comme par exemple, l'IFN γ qui est connu pour être une cytokine effectrice soutenant la polarisation Th1. En effet, les cellules tumorales possèdent des récepteurs à l'IFN γ dont le signal induit l'expression des ligands PD-L1 et PD-L2 (77), cela concerne également les cellules stromales et les exosomes tumoraux (78). Le signal initié par l'IFN γ favorise donc la synapse inhibitrice PD-1/PD-L1 dont le but est de réguler négativement la réponse immunitaire cytotoxique. Certes, des travaux ont montré

que le taux de cytokines sériques pouvait être corrélé à la réponse sous inhibiteurs des points de contrôle immunitaire tels que l'IL-8 dans le mélanome (80). D'autres données décrivent que les patients résistants au nivolumab montreraient également des taux initiaux d'IFN γ , d'IL-6 et d'IL-10 plus élevés (81). Cependant, à ce jour, aucun biomarqueur cytokinique sérique n'a été validé pour prédire la réponse sous immunothérapie. Conformément aux résultats de la littérature et bien que notre cohorte présente un effectif restreint, nous n'avons pas mis en évidence de marqueur prédictif à partir de l'analyse du sécrétome des patients. Actuellement, le seul marqueur sérique utilisé en pratique clinique est le taux de LDH qui est corrélé à la survie globale des patients atteints d'un mélanome avancé mais n'est pas en lien avec la réponse aux traitements (79).

D'autre part, nous avons évalué la capacité de réserve respiratoire cellulaire qui correspond à la différence entre le taux de consommation d'oxygène maximal et le taux de respiration basale. Ce marqueur reflète la capacité mitochondriale de la cellule à produire de l'énergie dans des conditions de stress comme par exemple l'activité physique, des conditions de température extrême... C'est un indicateur essentiel de la bioénergétique cellulaire permettant d'évaluer les capacités d'adaptation métabolique de la cellule à assurer des besoins énergétiques supplémentaires en lien avec différents stress/stimuli. Il s'agit d'un facteur important pour la survie et la fonction cellulaires à long terme (87,88). En effet, une équipe a mis en évidence sur des cultures cellulaires de rat que plus la capacité de réserve respiratoire était élevée, meilleure était la survie cellulaire en condition d'hypoxie (82). Par ailleurs, ils ont montré que cette augmentation de production d'énergie cellulaire était régulée par certaines protéines régulatrices telles que l'*AMP-activated protein Kinase* (AMPK) permettant une activation du complexe II de la chaîne

respiratoire (82). Par ailleurs, l'équipe de Sharping a montré que la fonction lymphocytaire était maintenue à long terme dans les maladies chroniques telles que le cancer grâce à l'activité métabolique mitochondriale (46). Ce serait l'activation persistante du signal intracellulaire Akt du lymphocyte induit par les multiples signaux du microenvironnement tumoral qui serait responsable de la répression de l'OXPPOS et par conséquent entraînerait une diminution de la capacité de réserve respiratoire (46). Ainsi, la réduction de la masse mitochondriale du lymphocyte effecteur provoque une dépendance à la glycolyse ainsi qu'une instabilité sur le plan bioénergétique, car il perd l'avantage de produire de l'énergie à partir de divers substrats *via* l'OXPPOS (89). En conséquence, le lymphocyte T n'est alors plus capable de s'adapter aux conditions de son environnement voire de répondre à la stimulation provoquée par l'immunothérapie anti-PD-1 du fait d'une impossibilité à engager des ressources énergétiques supplémentaires. Dans notre cohorte, nous avons montré qu'il existait une augmentation significative de la capacité de réserve respiratoire des PBMCs, dès une cure d'anti-PD-1, chez les patients présentant une réponse sous traitement. Contrairement aux patients résistants à l'immunothérapie où il n'est pas retrouvé de modification de la capacité de réserve. Cette donnée reste à confirmer sur un effectif de patient plus conséquent mais pourrait être un marqueur précoce de réponse aux immunothérapies illustrant la capacité des cellules immunitaires à s'adapter et à répondre à la stimulation provoquée par l'anti-PD-1. Par ailleurs, la capacité de réserve respiratoire mitochondriale pourrait être une cible thérapeutique prometteuse en oncologie au vu de son rôle dans le fonctionnement et la survie des lymphocytes T.

De plus, nous avons identifié chez nos 5 patients une corrélation linéaire et précoce entre le rapport OCR/ECAR mesuré sur les PBMCs avant et après un cycle

d'immunothérapie anti-PD-1 et la meilleure réponse tumorale obtenue sous traitement à 6 mois. Une étude portant sur un modèle murin d'infection aiguë a mis en évidence que les changements du métabolisme des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du virus apparaissaient dès une semaine d'infection (48). En effet, ces lymphocytes consommaient de manière réduite le glucose malgré l'activation persistante de la protéine mTOR dont le rôle est de réguler positivement les voies anaboliques. Il a été montré que ces altérations glycolytiques et mitochondriales précoces étaient régulées par PD-1 (**Fig.D**) via l'inhibition du facteur transcriptionnel PGC-1 α (48). Lorsque la stimulation antigénique devient chronique (cancer/infection), cela provoque une surexpression de PD-1 des lymphocytes T et s'associe à des défauts fonctionnels correspondant au phénotype « *exhausted* ». Il a été démontré dans ce contexte que l'inhibition de PD-1 ne permettait pas de rétablir le fonctionnement métabolique du lymphocyte T qui perd sa fonction effectrice de manière irréversible en réponse à l'exposition continue à divers signaux inhibiteurs (83,84).

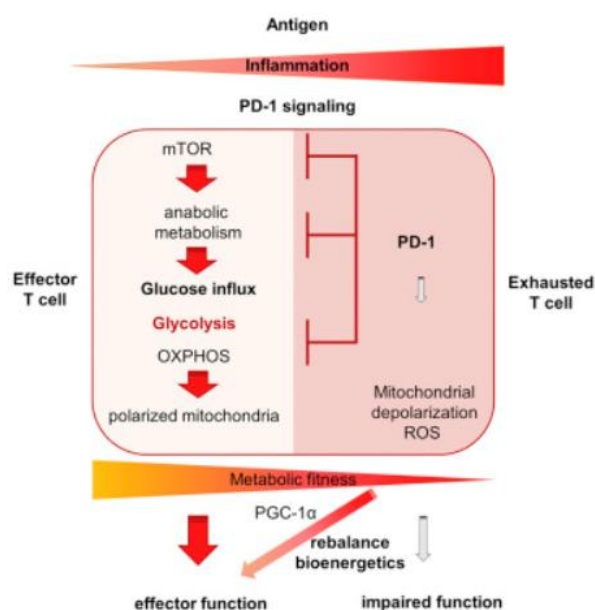


Figure D. Impact des voies de signalisation sur le métabolisme du lymphocyte T et répercussion sur sa fonction effectrice d'après l'article de Bertram Bengsch et al. Cell, 2016.

Par ailleurs, Yost a constaté que la majorité des TILs présentait des TCR différents après traitement par anti-PD-1 en comparaison à ceux retrouvés avant l'introduction de l'immunothérapie (52). La même équipe a montré que ces nouveaux lymphocytes spécifiques à la tumeur suivant une immunothérapie provenaient du sang périphérique, suggérant la possibilité d'un recrutement immunitaire sous anti-PD-1 (52,53). L'immunothérapie anti-PD-1 mobiliserait donc de nouveaux TILs au sein de la tumeur à partir du sang périphérique en plus d'amplifier les fonctions effectrices des TILs préexistants dont l'activation et l'épuisement chronique limitent les capacités de régénération. Récemment, une équipe a montré que le rapport entre la capacité de l'immunothérapie anti-PD-1 à restaurer la fonction des lymphocytes T CD8+ du sang périphérique de patients en fonction de la charge tumorale avant traitement était corrélé à la réponse à l'anti-PD-1 (50).

Actuellement, grâce à la technique d'analyse de flux extracellulaires par le XFseahorse, il est possible de mesurer en temps réel l'activité de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative et ainsi évaluer l'état bioénergétique des PBMCs circulants avant et après traitement. Bien que peu d'études aient été basées sur la recherche de facteurs prédictifs sur les PBMCs à partir d'échantillons sanguins, il s'agit d'un geste facilement réalisable et renouvelable au cours du traitement en pratique clinique et utilisant des techniques de laboratoire simples et rapides. Ainsi, nous avons pu montrer qu'au plus le ratio OCR/ECAR est faible, au plus les cellules immunitaires engagent les voies métaboliques anaboliques sous anti-PD-1, indispensables au maintien de leurs fonctions effectrices et support de la réponse anti-tumorale. Il existe donc une corrélation entre les modifications précoces du métabolisme des PBMCs des patients sous immunothérapie anti-PD-1 et la réponse tumorale à 6 mois. Par conséquent, la différence de réponse des patients à

l'immunothérapie anti-PD-1 pourrait s'expliquer en partie par la capacité des cellulaires immunitaires à reprogrammer leur métabolisme. Actuellement, plusieurs équipes travaillent sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques en lien avec le métabolisme cellulaire dans le but de proposer de nouvelles associations en particulier avec les inhibiteurs d'immunes checkpoints et ainsi optimiser la réponse anti-tumorale. Il s'agit d'un véritable challenge puisque la plupart des cibles sont également le support de fonctions cellulaires physiologiques indispensables. Par conséquent, effectuer cette évaluation sur un effectif plus important de patients pourrait fournir un seuil pour le rapport OCR/ECAR qui pourrait déterminer la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 après seulement une cure de traitement. En cas de validation de ce biomarqueur prédictif, ce dernier pourrait également être testé dans l'évaluation précoce de la réponse à l'association ou au traitement séquentiel entre l'immunothérapie anti-PD-1 et les thérapies ciblées dans le mélanome. Ces données ouvrent des perspectives et pourraient s'appliquer à d'autres types de cancer où il existe une indication à l'immunothérapie anti-PD-1 comme le cancer de vessie, rein, poumon et lymphome de Hodgkin.

CONCLUSION

Cette étude met en évidence une corrélation précoce entre les modifications du métabolisme des PBMCs dès une seule cure d'immunothérapie anti-PD-1 et la réponse tumorale à 6 mois chez nos 5 patients atteints d'un mélanome métastatique. De même, il semble que l'amélioration de la capacité de réserve respiratoire des PBMCs après une cure d'anti-PD-1 chez nos patients soit également en lien avec la réponse tumorale à 6 mois des patients.

Il s'agit de données très intéressantes car actuellement aucun biomarqueur de la réponse aux immunothérapies dans le mélanome n'est établi. En cas de validation de ces résultats sur un effectif plus important, ces marqueurs permettraient une adaptation thérapeutique rapide chez les patients non-répondeurs à l'immunothérapie anti-PD-1 et pourraient donc avoir un impact sur le pronostic.

En outre, ces marqueurs pourraient également être une aide dans l'évaluation de nouveaux protocoles thérapeutiques notamment pour les combinaisons de différents traitements ou pour déterminer les séquences thérapeutiques optimales entre différents traitements. Par ailleurs, ils pourraient ouvrir de nouvelles pistes de développement thérapeutique dans le mélanome.

Enfin, ces données pourraient avoir un impact non négligeable sur les coûts liés la santé en optimisant la prise en charge thérapeutique des patients. A l'heure actuelle, il est important de responsabiliser l'ensemble des acteurs à cette problématique afin de maintenir et d'assurer un accès aux soins pour tous et sur le long terme.

PERSPECTIVES

I] L'immunométabolisme : nouvelle cible thérapeutique anti-cancéreuse

Au vu de nos résultats et des données de la littérature, il semble donc que le métabolisme des populations immunitaires puisse être une cible thérapeutique afin d'améliorer la réponse anti-tumorale. Ces résultats sont illustrés notamment dans la thérapie cellulaire adoptive où le métabolisme des lymphocytes prélevés semble jouer un rôle majeur dans l'efficacité thérapeutique. Ces traitements consistent à prélever des lymphocytes autologues soit à partir de la tumeur soit à partir du sang du patient. Dans certains cas, les lymphocytes prélevés vont être modifiés génétiquement *in vitro* afin d'exprimer un récepteur spécifique (TCR) chimérique de l'antigène tumoral (90,91), ce protocole est connu sous le nom de CAR-T cell. Lorsque les lymphocytes spécifiques de la tumeur sont isolés, ils vont être placés dans des milieux de culture enrichis en IL-2 afin de favoriser l'expansion cellulaire. La compréhension du métabolisme des lymphocytes T a montré toute son importance dans l'optimisation de l'efficacité thérapeutique anti-tumorale. En effet, au cours de la phase d'expansion *in vitro*, il a été montré que plus l'activité métabolique était médiée par la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras, plus les cellules T avaient une longue durée de vie et de meilleures capacités prolifératives et effectrices lors de la ré-infusion chez le patient (33,92).

Par ailleurs, d'autres équipes se sont intéressées à cibler le métabolisme des cellules tumorales plutôt que celui des populations immunitaires permettant de rétablir un microenvironnement favorable à l'acquisition des fonctions effectrices et cytotoxiques immunes. Une molécule connue pour son action sur le métabolisme a été étudiée, il s'agit de la metformine. En effet, cette molécule cible le complexe I de la chaîne mitochondriale et active la voie AMPK (93). Plusieurs rapports ont décrit les

effets potentiels de la metformine, comme médicament anticancéreux. Des essais contrôlés ont montré que la metformine pouvait prévenir la croissance tumorale et améliorer le pronostic clinique de certains cancers dont le mélanome (94). Cependant, des travaux ont démontré que l'AMPK pouvait avoir des actions contradictoires à la fois antitumorales et protumorales (95). L'AMPK peut inhiber la signalisation de mTOR bloquant la prolifération des cellules tumorales (95) mais favorise également l'adaptation des cellules cancéreuses aux stress métaboliques augmentant ainsi leur survie (96).

II] Impact des associations ou des traitements séquentiels utilisés dans le mélanome

Dès 2014, une première association a été proposée entre le pembrolizumab et un inhibiteur d'une enzyme métabolique appelée IDO. Cette enzyme est exprimée par différentes cellules en conditions pathologiques telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules dendritiques (97). Plusieurs types de cancers dont le mélanome montrent également une surexpression d'IDO dont le niveau d'expression est corrélé à un mauvais pronostic chez les patients (98,99). En effet, IDO joue un rôle important dans la cancérogenèse et provoque une tolérance immunitaire par la régulation des cellules NK, des lymphocytes T, des Tregs, ainsi que des MDSCs (100). L'activité enzymatique d'IDO est de métaboliser le tryptophane en kynurénine diminuant ainsi la disponibilité du tryptophane pour les cellules T. Cette déplétion induit un arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T et favorise leur apoptose via l'inhibition de mTORC1 (100,101). De plus, l'augmentation de kynurénine favoriserait la différenciation des T CD4⁺ en Tregs dans le microenvironnement tumoral

(100,101). Cette enzyme a donc été la cible de plusieurs essais avec le développement d'inhibiteurs d'IDO montrant de résultats prometteurs en association avec un anti-PD-1 dans les études de phase I/II mais l'essai de phase III a été abandonné en raison de l'absence d'amélioration de la survie sans progression et de la survie globale en comparaison à la monothérapie anti-PD-1 (102).

Des études sont également en cours pour déterminer le traitement séquentiel optimal chez les patients atteints d'un mélanome entre les thérapies ciblées et les immunothérapies **(103,104)**. En effet, les thérapies ciblées anti-RAF et anti-MEK entraînent une diminution de l'utilisation du glucose et par conséquent la glycolyse dans les cellules de mélanome **(105,106)**. Cet effet inhibiteur sur la glycolyse des cellules tumorales est notamment bien illustré par les réponses importantes et rapides sur les tumeurs visibles par TEP-scanner avant et après traitement **(107)**. Cependant, certaines cellules tumorales sont capables de s'adapter à cette inhibition métabolique en activant la voie de l'autophagie favorisant ainsi la phosphorylation oxydative comme voie métabolique principale **(108,109)**. Cette adaptation leur laisse le temps d'acquérir d'autres mutations dont certaines auront pour effet de créer une résistance aux thérapies ciblées **(108)**. Ces données sont intéressantes car elles posent la question d'instaurer une immunothérapie au moment de l'action inhibitrice des thérapies ciblées sur la glycolyse des cellules tumorales. En effet, on peut émettre l'hypothèse que le glucose est plus disponible au sein du microenvironnement tumoral grâce à l'action des thérapies ciblées. Il s'agirait donc du moment idéal pour instaurer une immunothérapie anti-PD-1 puisque les TILs ayant les ressources bioénergétiques nécessaires seraient alors capable de s'activer sous immunothérapie. Ils seraient également intéressant d'étudier l'impact indirect

des thérapies ciblées sur le métabolisme des populations immunitaires en intratumoral. Ces données permettraient peut-être de déterminer la séquence optimale entre immunothérapie et thérapies ciblées dans le traitement du mélanome métastatique muté BRAF.

BIBLIOGRAPHIE

1. Berwick M, Buller DB, Cust A, Gallagher R, Lee TK, Meyskens F, et al. Melanoma Epidemiology and Prevention. *Cancer Treat Res.* 2016;167:17-49.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* nov 2018;68(6):394-424.
3. A.V. Guizard, S. Plouvier, A.S. Woronoff, E. Marrer. ESTIMATIONS NATIONALES DE L'INCIDENCE ET DE LA MORTALITÉ PAR CANCER EN FRANCE MÉTROPOLITAINE ENTRE 1990 ET 2018 175 VOLUME 1 : TUMEURS SOLIDES / Mélanome de la peau. registres des cancers du réseau Francim [Internet]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr> › content › download
4. National Cancer Institute SEER stat fact sheets: Melanoma of the skin. Disponible sur: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
5. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* sept 2017;170(6):1109-1119.e10.
6. Liu BL, Robinson M, Han Z-Q, Branston RH, English C, Reay P, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* févr 2003;10(4):292-303.
7. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 22 mars 2012;12(4):252-64.
8. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* déc 2001;1(3):220-8.
9. Franchina DG, He F, Brenner D. Survival of the fittest: Cancer challenges T cell metabolism. *Cancer Lett.* 01 2018;412:216-23.
10. Bertrand A, Kostine M, Barnette T, Truchetet M-E, Schaeffer T. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 4 sept 2015;13:211.
11. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2 juill 2015;373(1):23-34.
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.* 25 juin 2015;372(26):2521-32.
13. 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.

14. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 26 2017;168(3):542.
15. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. sept 2016;375(9):819-29.
16. Ribas A, Hamid O, Daud A, Hodi FS, Wolchok JD, Kefford R, et al. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA*. 19 avr 2016;315(15):1600.
17. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity*. 17 2016;44(5):1069-78.
18. Kalbasi A, Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat Rev Immunol*. 30 sept 2019;
19. Bence C, Hofman V, Chamorey E, Long-Mira E, Lassalle S, Albertini AF, et al. Association of combined PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes features with survival and treatment outcomes in patients with metastatic melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 18 oct 2019;
20. Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2019;8(7):1593806.
21. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2016;4:59.
22. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. août 2015;15(8):486-99.
23. Davoodzadeh Gholami M, kardar GA, Saeedi Y, Heydari S, Garssen J, Falak R. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: Significance and effective mechanisms. *Cell Immunol*. déc 2017;322:1-14.
24. Baitsch L, Fuertes-Marraco SA, Legat A, Meyer C, Speiser DE. The three main stumbling blocks for anticancer T cells. *Trends Immunol*. juill 2012;33(7):364-72.
25. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis*. 18 juin 2015;6:e1792.
26. Ngiow SF, Young A, Jacquelot N, Yamazaki T, Enot D, Zitvogel L, et al. A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Res*. 15 sept 2015;75(18):3800-11.
27. Simon S, Vignard V, Florenceau L, Dreno B, Khammari A, Lang F, et al. PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1104448.

28. Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 sept 2008;105(39):15016-21.
29. Sen DR, Kaminski J, Barnitz RA, Kurachi M, Gerdemann U, Yates KB, et al. The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science*. 02 2016;354(6316):1165-9.
30. Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity*. 14 déc 2012;37(6):1130-44.
31. Miller BC, Sen DR, Al Aboosy R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol*. 2019;20(3):326-36.
32. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med*. 24 août 2015;212(9):1345-60.
33. Kishton RJ, Sukumar M, Restifo NP. Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *Cell Metab*. 5 juill 2017;26(1):94-109.
34. Herbel C, Patsoukis N, Bardhan K, Seth P, Weaver JD, Boussiotis VA. Clinical significance of T cell metabolic reprogramming in cancer. *Clin Transl Med*. déc 2016;5(1):29.
35. Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, et al. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 avr 2008;180(7):4476-86.
36. Cham CM, Gajewski TF. Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8+ effector T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 avr 2005;174(8):4670-7.
37. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*. 18 avr 2013;38(4):633-43.
38. Chang C-H, Curtis JD, Maggi LB, Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*. 6 juin 2013;153(6):1239-51.
39. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. nov 2004;4(11):891-9.
40. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 20 mars 2012;21(3):297-308.
41. Warburg, O. Ueber den stoffwechsel der tumoren. 1930;

42. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 mars 2011;144(5):646-74.
43. Shevchenko I, Bazhin AV. Metabolic Checkpoints: Novel Avenues for Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:1816.
44. Chang C-H, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*. 10 sept 2015;162(6):1229-41.
45. Cham CM, Driessens G, O'Keefe JP, Gajewski TF. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. sept 2008;38(9):2438-50.
46. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, et al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*. 16 2016;45(2):374-88.
47. Kouidhi S, Elgaaied AB, Chouaib S. Impact of Metabolism in on T-Cell Differentiation and Function and Cross Talk with Tumor Microenvironment. *Front Immunol* [Internet]. 13 mars 2017 [cité 3 nov 2019];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00270/full>
48. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, Odorizzi PM, Pauken KE, Attanasio J, et al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity*. 16 2016;45(2):358-73.
49. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* [Internet]. nov 2015 [cité 23 oct 2019];6(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms7692>
50. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 04 2017;545(7652):60-5.
51. Kamphorst AO, Pillai RN, Yang S, Nasti TH, Akondy RS, Wieland A, et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 09 2017;114(19):4993-8.
52. Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, Qi Y, Wang C, Kageyama R, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat Med*. 2019;25(8):1251-9.
53. Callahan MK, Wolchok JD. Recruit or Reboot? How Does Anti-PD-1 Therapy Change Tumor-Infiltrating Lymphocytes? *Cancer Cell*. 16 sept 2019;36(3):215-7.

54. Wieland A, Kamphorst AO, Adsay NV, Masor JJ, Sarmiento J, Nasti TH, et al. T cell receptor sequencing of activated CD8 T cells in the blood identifies tumor-infiltrating clones that expand after PD-1 therapy and radiation in a melanoma patient. *Cancer Immunol Immunother* Cll. nov 2018;67(11):1767-76.
55. Zhu L, Zhao Q, Yang T, Ding W, Zhao Y. Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *Int Rev Immunol*. janv 2015;34(1):82-100.
56. Liu P-S, Wang H, Li X, Chao T, Teav T, Christen S, et al. α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol*. sept 2017;18(9):985-94.
57. O'Neill LAJ, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med*. 11 janv 2016;213(1):15-23.
58. Kelly B, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*. juill 2015;25(7):771-84.
59. Mah AY, Cooper MA. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ Production. *Crit Rev Immunol*. 2016;36(2):131-47.
60. Keating SE, Zaiatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, et al. Metabolic Reprogramming Supports IFN- γ Production by CD56bright NK Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 mars 2016;196(6):2552-60.
61. Donnelly RP, Loftus RM, Keating SE, Liou KT, Biron CA, Gardiner CM, et al. mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 nov 2014;193(9):4477-84.
62. Wang Y-A, Li X-L, Mo Y-Z, Fan C-M, Tang L, Xiong F, et al. Effects of tumor metabolic microenvironment on regulatory T cells. *Mol Cancer*. 26 2018;17(1):168.
63. Gerriets VA, Kishton RJ, Johnson MO, Cohen S, Siska PJ, Nichols AG, et al. Foxp3 and Toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression. *Nat Immunol*. déc 2016;17(12):1459-66.
64. Galgani M, De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Role of Metabolism in the Immunobiology of Regulatory T Cells. *J Immunol*. 1 oct 2016;197(7):2567-75.
65. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 13 avr 2015;27(4):450-61.
66. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang C-H, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 11 oct 2013;342(6155):1242454.
67. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell*. 09 2018;33(4):547-62.

68. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 avr 2016;22(8):1856-64.
69. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity.* 17 2016;44(5):955-72.
70. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(9):553-65.
71. Rodríguez-Prados J-C, Través PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 2010;185(1):605-14.
72. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 10 juin 2010;115(23):4742-9.
73. Doughty CA, Bleiman BF, Wagner DJ, Dufort FJ, Mataraza JM, Roberts MF, et al. Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood.* 1 juin 2006;107(11):4458-65.
74. Yamaguchi K, Mishima K, Ohmura H, Hanamura F, Ito M, Nakano M, et al. Activation of central/effector memory T cells and T-helper 1 polarization in malignant melanoma patients treated with anti-programmed death-1 antibody. *Cancer Sci.* oct 2018;109(10):3032-42.
75. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest.* 1 août 2017;127(8):2930-40.
76. Yang Z, Qi Y, Lai N, Zhang J, Chen Z, Liu M, et al. Notch1 signaling in melanoma cells promoted tumor-induced immunosuppression via upregulation of TGF- β 1. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 4 janv 2018;37(1):1.
77. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* 09 2017;19(6):1189-201.
78. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature.* 2018;560(7718):382-6.
79. Kagamu H, Yamaguchi O, Shiono A, Mouri A, Miyauchi S, Utsugi H, et al. CD4+ T cells in PBMC to predict the outcome of anti-PD-1 therapy. *J Clin Oncol.* 20 mai 2017;35(15_suppl):11525-11525.
80. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and

- predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 août 2017;28(8):1988-95.
81. Yamazaki N, Kiyohara Y, Uhara H, Iizuka H, Uehara J, Otsuka F, et al. Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Sci.* mai 2017;108(5):1022-31.
 82. Pflieger J, He M, Abdellatif M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis.* 30 juill 2015;6:e1835.
 83. Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology.* juin 2008;134(7):1927-37, 1937.e1-2.
 84. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, et al. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity.* 16 2016;45(2):389-401.
 85. Carthon BC, Wolchok JD, Yuan J, Kamat A, Ng Tang DS, Sun J, et al. Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mai 2010;16(10):2861-71.
 86. Tarhini AA, Edington H, Butterfield LH, Lin Y, Shuai Y, Tawbi H, et al. Immune monitoring of the circulation and the tumor microenvironment in patients with regionally advanced melanoma receiving neoadjuvant ipilimumab. *PLoS One.* 2014;9(2):e87705.
 87. Choi SW, Gerencser AA, Nicholls DG. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J Neurochem.* mai 2009;109(4):1179-91.
 88. Nicholls DG. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity. *Biochem Soc Trans.* déc 2009;37(Pt 6):1385-8.
 89. van der Windt GJW, Everts B, Chang C-H, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity.* 27 janv 2012;36(1):68-78.
 90. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science.* 3 avr 2015;348(6230):62-8.
 91. Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell.* 09 2017;168(4):724-40.
 92. Sukumar M, Kishton RJ, Restifo NP. Metabolic reprogramming of anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* juin 2017;46:14-22.

93. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*. sept 2013;56(9):1898-906.
94. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis*. 1 sept 2011;2:e199.
95. Dandapani M, Hardie DG. AMPK: opposing the metabolic changes in both tumour cells and inflammatory cells? *Biochem Soc Trans*. avr 2013;41(2):687-93.
96. Zhao Y, Hu X, Liu Y, Dong S, Wen Z, He W, et al. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol Cancer*. 13 2017;16(1):79.
97. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. oct 2003;9(10):1269-74.
98. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 févr 2006;12(4):1144-51.
99. Weinlich G, Murr C, Richardsen L, Winkler C, Fuchs D. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatol Basel Switz*. 2007;214(1):8-14.
100. Bilir C, Sarisozen C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Only an enzyme or a checkpoint controller? *J Oncol Sci*. juill 2017;3(2):52-6.
101. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, et al. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. *Front Immunol*. 2018;9:151.
102. Komiya T, Huang CH. Updates in the Clinical Development of Epcadostat and Other Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Inhibitors (IDO1) for Human Cancers. *Front Oncol*. 2018;8:423.
103. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, et al. Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(10):1315-27.
104. Sullivan RJ, Gonzalez R, Lewis KD, et al. Atezolizumab (A) + cobimetinib (C) + vemurafenib (V) in BRAF-V600-mutant metastatic melanoma (mel): updated safety and clinical activity. *J Clin Oncol*. 2017;
105. Marchetti P, Guerreschi P, Kluza J, Mortier L. Metabolic features of melanoma: a gold mine of new therapeutic targets? *Curr Cancer Drug Targets*. 2014;14(4):357-70.

106. Hosseini M, Kasraian Z, Rezvani HR. Energy metabolism in skin cancers: A therapeutic perspective. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* août 2017;1858(8):712-22.
107. Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature.* 30 sept 2010;467(7315):596-9.
108. Marchetti P, Trinh A, Khamari R, Kluza J. Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* avr 2018;1862(4):999-1005.
109. Ma X-H, Piao S-F, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest.* mars 2014;124(3):1406-17.

ANNEXES

Annexe 1 : Classification du mélanome par l’American Joint Committee on Cancer (AJCC), 8ème édition

AJCC Melanoma of the Skin Staging 8th Edition

Definitions

Primary Tumor (T)

- TX** Primary tumor cannot be assessed (for example, curettaged or severely regressed melanoma)
- T0** No evidence of primary tumor
- Tis** Melanoma in situ
- T1** Melanomas 1.0 mm or less in thickness
- T2** Melanomas 1.1 - 2.0 mm
- T3** Melanomas 2.1 - 4.0 mm
- T4** Melanomas more than 4.0 mm

NOTE: a and b subcategories of T are assigned based on ulceration and thickness as shown below:

T CLASSIFICATION	THICKNESS (mm)	ULCERATION STATUS
T1	≤1.0	a: Breslow < 0.8 mm w/o ulceration b: Breslow 0.8-1.0 mm w/o ulceration or ≤ 1.0 mm w/ ulceration.
T2	1.1-2.0	a: w/o ulceration b: w/ ulceration
T3	2.1-4.0	a: w/o ulceration b: w/ ulceration
T4	>4.0	a: w/o ulceration b: w/ ulceration

Regional Lymph Nodes (N)

- NX** Patients in whom the regional nodes cannot be assessed (for example previously removed for another reason)
- N0** No regional metastases detected
- N1-3** Regional metastases based on the number of metastatic nodes, number of palpable metastatic nodes on clinical exam, and presence or absence of MSI²

NOTE: N1-3 and a-c subcategories assigned as shown below:

N CLASSIFICATION	# NODES	CLINICAL DETECTABILITY/MSI STATUS
N1	0-1 node	a: clinically occult ¹ , no MSI ² b: clinically detected ¹ , no MSI ² c: 0 nodes, MSI present ²
N2	1-3 nodes	a: 2-3 nodes clinically occult ¹ , no MSI ² b: 2-3 nodes clinically detected ¹ , no MSI ² c: 1 node clinical or occult ¹ , MSI present ²
N3	>1 nodes	a: >3 nodes, all clinically occult ¹ , no MSI ² b: >3 nodes, ≥1 clinically detected ¹ or matted, no MSI ² c: >1 nodes clinical or occult ¹ , MSI present ²

Distant Metastasis (M)

- M0** No detectable evidence of distant metastases
- M1a** Metastases to skin, sub cutaneous, or distant lymph nodes
- M1b** Metastases to lung
- M1c** Metastases to all other visceral sites
- M1d** Metastases to brain

NOTE: Serum LDH is incorporated into the M category as shown below:

M CLASSIFICATION	SITE	Serum LDH
M1a-d	Skin/subcutaneous/nodule (a), lung (b) other visceral (c), brain (d)	Not assessed
M1a-d(0)	Skin/subcutaneous/nodule (a), lung (b) other visceral (c), brain (d)	Normal
M1a-d(1)	Skin/subcutaneous/nodule (a), lung (b) other visceral (c), brain (d)	Elevated

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS							
Clinical Staging ³				Pathologic Staging ⁴			
Stage 0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
Stage IB	T1b	IB	T1b
	T2a		T2a
Stage IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	M0	M0
	T3a		T2a
Stage IIB	T3b	IIB	T3b
	T4a		T4a
Stage IIC	T4b	IIC	T4b
Stage III	Any T	≥N1	M0	IIIA	T1-2a	N1a	M0
		T1-2a	N2a	..
	IIIB	T0	N1b-c	M0
		T1-2a	N1b-c	..
		T1-2a	N2b	..
		T2b-3a	N1a-2b	..
	IIIC	T0	N2b-c	M0
		T0	N3b-c	..
		T1a-3a	N2c-3c	..
		T3b-4a	Any N	..
		T4b	N1a-2c	..
	IIID	T4b	N3a-c	M0
Stage IV	Any N	Any N	M1	IV	Any T	Any N	M1

Référence : Gershenwald JE, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin.nov 2017;(6):472-92.

Annexe 2 : Amendement au projet MELBASE validé par le Comité de Protections des Personnes

CPP Ile de France XI Comité de Protection des Personnes

Saint-Germain-en-Laye, le 15 décembre 2017

Madame Emmanuelle LIEGEY
Carré historique de l'hôpital Saint Louis
DRCD, Secteur gris-porte 23
1, avenue Claude Vellefaux
75475 PARIS

Titre de l'essai :	« Constitution et suivi d'une cohorte nationale de patients atteints de mélanome stade III inopérable ou stade IV avec collection virtuelle d'échantillons biologiques » MELBASE
Promoteur :	AP-HP
Coordonnateur :	Pr. LEBBE
Réf. Promoteur :	NI12005 MELBASE
N° IDRCB :	
Réf. CPP :	12027

Modification substantielle n° 4 : <ul style="list-style-type: none"> • <i>Courrier de demande de modification</i> • <i>Tableau comparatif des modifications</i> • <i>Protocole</i> • <i>Lettre d'information et formulaire de consentement</i> • <i>Lettre d'information pour les patients déjà inclus</i> • <i>Argumentaire des modifications apportées au CRF</i> • <i>Cv des investigateurs</i> 	Version courrier du 12/10/2017 Joint V6 du 02/10/2017 V4.0 du 02/10/2017 V1.0 du 02/10/2017 joints
--	---

Le CPP Ile de France XI a examiné dans sa séance du **14 DECEMBRE 2017**, la modification substantielle au projet de recherche référencé ci-dessus.

Ont participé à la délibération :

I - PREMIER COLLEGE

Annie DURAND
Kolia MILOJEVIC
Sabine de la PORTE
Ariane QUEFFELEC

Pharmacien Hospitalier
Biostatisticien
Chercheur
Médecin

II - DEUXIEME COLLEGE

Michèle CATZ
Christine GHESTEM
Odile LACHAUD
Jean-François LAIGNEAU
Olivier LANTRES
Léon LOISEAU
Nicole TAVERNY
Christine STOUFFLET

Psychologue
Association des familles du Vésinet
Représentant UDAF 78
Avocat
Avocat
Philosophe
Association des familles du Vésinet
Philosophe

Aucun membre délibérant du comité n'est affecté par un conflit d'intérêt.

J'ai l'honneur de vous informer que le comité a donné pour cette modification substantielle :

UN AVIS FAVORABLE

Michèle CATZ, présidente – Sabine de la PORTE, Vice-présidente
Jean-François LAIGNEAU, Secrétaire
Anne-Elisabeth DECARIS, Assistante Médico-Administrative
Pavillon Jacques Courtois – 2^{ème} étage, 20, rue Armagis 78105 Saint Germain en Laye Cedex
Tél : 01.39.27.42.58 - Fax : 01.39.27.49.01
E.mail : cppidf11@chi-poissy-st-germain.fr

CPP Ile de France XI Comité de Protection des Personnes

Réf. Promoteur:	NI12005 MELBASE
Réf. CPP:	12027

Cette modification substantielle porte sur les éléments suivants :

- Modification des critères d'inclusions
- Prolongation de 2 ans du suivi
- Augmentation du nombre de patients inclus dans la cohorte
- Prolongation de la durée d'inclusion des patients
- Ajout de la possibilité de stocker les PBMC
- Ajout du centre d'Avicennes
- Modification des investigateurs principaux des centres de Bordeaux, Bichat, Nice.
- Mise à jour du CRF

Michèle CATZ, **Présidente de la séance**



Annexe 3 : Critères d'évaluation de la réponse tumorale dans les cancers solides (RECIST) version 1.1

Lésions à l'inclusion:

Les lésions et les ganglions sont classés individuellement comme étant mesurable ou non mesurable.

Maladie mesurable

Pour qu'une lésion soit jugée mesurable, au moins une de ses dimensions doit pouvoir être mesurée de façon précise (la dimension la plus longue, dans le plan de la prise de mesures, devra être rapportée).

Pour être mesurables, les lésions doivent présenter une mesure minimum de

- ♦ ≥ 10 mm au scanner (pour autant que la largeur de bande du CT-scan soit d'au maximum 5 mm)
- ♦ ≥ 10 mm par examen clinique (mesurable par pied à coulisse) (les lésions qui ne peuvent être mesurées précisément doivent être répertoriées comme étant non-mesurables)
- ♦ 20 mm par radiographie (=X-ray) du thorax
- ♦ Pour qu'un ganglion lymphatique malin soit considéré pathologique et mesurable, celui-ci doit présenter un plus petit axe ≥ 15 mm (le plus petit axe étant l'axe perpendiculaire à la plus grande dimension du ganglion). Seule la longueur de ce plus petit axe sera rapportée tant à l'entrée que durant le suivi.

Maladie non-mesurable

Toutes les autres lésions, incluant les petites lésions (plus grand diamètre < 10 mm au scanner ou les ganglions lymphatiques dont le plus petit axe est ≥ 10 mm et < 15 mm) ainsi que les lésions réellement non-mesurables : maladie leptoméningée, ascite, pleurésie, péricardite, maladie inflammatoire du sein, lymphangites carcinomateuses pulmonaires ou cutanées, les masses abdomino-pelviennes décelées par l'examen clinique mais non confirmées à l'imagerie et les lésions kystiques.

Nota bene : les lésions osseuses, les lésions kystiques simples et les lésions ayant précédemment reçu un traitement local nécessitent une considération particulière (cf commentaires ci-dessous).

Lésions cibles

Les lésions cibles sont sélectionnées parmi les lésions mesurables que présente le malade à l'entrée de l'étude. **Au maximum 5 lésions cibles sont sélectionnées au total avec un maximum de 2 lésions cibles par organe.** La sélection des lésions cibles s'opérera de façon à être représentative de tous les organes envahis, en choisissant les lésions les plus grandes (dans leur plus grande dimension) qui de plus, pourront être suivies tout au long de l'essai avec la méthode utilisée lors de l'examen initial. Les ganglions lymphatiques peuvent être considérés comme lésions cibles si leur plus petit axe (mesuré au scanner) est ≥ 15 mm.

C'est la somme des diamètres de ces lésions cibles (plus grand axe pour les lésions, et plus petit axe pour les ganglions) qui sera suivie au long de l'essai pour évaluer la réponse ou la progression.

Lésions non-cibles

Toutes les autres lésions sont identifiées comme lésions non-cibles et sont également relevées à l'inclusion. Elles ne sont pas mesurées mais sont suivies tout au long de l'essai.

Critères de réponse au traitement :**Lésions cibles :**

Réponse complète (RC) : Disparition de toutes les lésions. De plus, tous les ganglions lymphatiques (cible ou non-cible), doivent avoir atteint une dimension < 10 mm dans leur *plus petit* axe.

Attention : les ganglions sélectionnés comme lésions cibles doivent toujours être mesurés (dimension du plus petit axe dans le plan anatomique utilisé pour l'examen BASELINE), même s'ils diminuent en taille durant l'étude et que leur petit axe devient < 10 mm. Dès lors, lorsque des ganglions sont utilisés comme lésion cible, la « somme » des dimensions des lésions n'est pas nécessairement nulle, même en cas de réponse complète, puisqu'un ganglion normal est défini comme ayant un plus petit axe < 10 mm. Pour obtenir une réponse complète chaque ganglion doit avoir atteint une dimension < 10 mm dans son plus petit axe.

Réponse partielle (RP) : Diminution d'au moins 30 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la somme initiale des diamètres (Examen BASELINE).

Progression (PD) : Augmentation ≥ 20 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la plus petite somme des diamètres observée durant l'étude (NADIR), y compris la visite de baseline. En plus de cette augmentation relative de 20%, cette somme doit augmenter d'au moins 0,5 cm. Nota bene : l'apparition d'une ou plusieurs nouvelles lésions est également considérée comme progression.

Attention : s'il existe une progression par rapport au NADIR et une réponse par rapport à l'examen BASELINE, c'est la progression qui prévaut.

Stabilisation (SD) : Ni RP (ou RC), ni PD.

Lésions non-cibles

Réponse complète : Disparition de toutes les lésions non-cibles et normalisation des marqueurs tumoraux. Tous les ganglions lymphatiques doivent avoir atteint un petit diamètre < 10 mm.

Réponse incomplète - Stabilisation : Persistance d'au moins une lésion non-cible et/ou marqueur tumoral au-dessus des normales.

Progression : Augmentation **indiscutable** de la taille des lésions non-cibles ou apparition d'une nouvelle lésion.

Réponse globale :

Lésions cibles	Lésions non-cibles	Nouvelle lésion	Réponse globale
RC	RC	Non	= RC
RC	Non RC/Non PD	Non	= RP
RC	Non évalué	Non	= RP
RP	Non PD ou pas tous évalués	Non	= RP
SD	Non PD ou pas tous évalués	Non	= SD
Pas tous évalués	Non PD	Non	= Non-évaluable
PD	Indifférent	Oui ou non	= PD
Indifférent	PD	Oui ou non	= PD
Indifférent	Indifférent	Oui	= PD

Commentaires relatifs à la mesurabilité des lésions à l'entrée

Lésions osseuses :

- ◆ l'imagerie par scintigraphie osseuse, PET-scan et « plain films » ne sont pas considérées comme étant adéquates pour la mesure des lésions osseuses. Cependant, ces techniques peuvent être utilisées pour confirmer la présence ou la disparition de lésions osseuses
- ◆ Les lésions osseuses de type lytique ou de type mélangé lytique-ostéoblastique, qui contiennent une composante identifiable de tissus mous, peuvent être considérées comme des lésions mesurables, pour autant qu'elles puissent être mesurées par des techniques d'imagerie cross-sectionnelle de type CT ou IRM, et que la composante de tissus mous remplissent les conditions de mesurabilité indiquées plus haut.

Lésions kystiques :

- ◆ Les lésions qui correspondent au diagnostic de simple kyste par radiographie ne sont pas considérées comme des lésions malignes (ni mesurables, ni non-mesurables)
- ◆ Les lésions kystiques de type malin peuvent être prises en compte comme lésion mesurable pour autant qu'elles remplissent les critères de mesurabilité définis plus haut. Cependant, si le patient présente d'autres lésions non kystiques, celles-ci seront préférablement choisies comme lésion cible.

Lésions préalablement traitées localement :

- ◆ Les lésions situées dans une région préalablement irradiée ou ayant reçu une autre thérapie loco-régionale ne sont en général pas considérées comme étant mesurables, à l'exception des lésions ayant progressé depuis le traitement local. Le protocole de l'étude doit détailler les conditions spécifiques permettant de considérer de telles lésions comme étant mesurables.

Référence : Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer janv 2009;45(2):228-47.

AUTEUR : Nom : LAMIAUX

Prénom : Marie

Date de soutenance : Mercredi 18 Décembre 2019 à 18h, pôle Recherche.

Titre de la thèse : Impact de l'immunothérapie anti-PD-1 sur l'homéostasie et le profil métabolique des cellules immunitaires de patients atteints d'un mélanome métastatique : étude translationnelle prospective

Thèse - Médecine - Lille 2019

Cadre de classement : Onco-dermatologie

DES + spécialité : DES de Dermatologie et Vénéréologie

Mots-clés : mélanome, anti-PD-1, résistance tumorale, métabolisme, immunité

Contexte : Depuis 2011, le traitement du mélanome métastatique a connu une révolution avec l'instauration des anti-immune checkpoints. Malheureusement, 60 à 70% des patients montrent une résistance innée ou acquise sous anti-PD-1. Aucun biomarqueur prédictif n'existe à ce jour pour déterminer de manière précoce la réponse au traitement. Or, de nouvelles données montrent un lien entre les modifications métaboliques et l'acquisition des fonctions des cellules immunitaires et pourraient être utilisées comme potentiel biomarqueur de la réponse anti-tumorale.

Méthodes : Il s'agit d'une étude prospective et translationnelle menée dans le service de Dermatologie du CHRU de Lille dirigé par le Professeur Mortier. Les analyses ont été réalisées au sein de l'UMR 8161 – *Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies* à l'Institut de Biologie de Lille dirigé par le Professeur Delhem en collaboration avec l'équipe du Professeur Marchetti au sein de l'UMR-S-1172 au Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert. Etaient inclus, tous les patients porteurs d'un mélanome avancé, traités par immunothérapie anti-PD-1. Des prélèvements sanguins étaient réalisés avant traitement et à 3 semaines d'une première cure. La réponse tumorale était évaluée à 3 et 6 mois de l'immunothérapie.

Résultats : De mars 2018 à mars 2019, cinq patients ont été inclus. Il semblerait que les patients ayant une réponse ou une stabilité de la maladie à 6 mois de l'immunothérapie anti-PD-1 présentent une augmentation de fréquence lymphocytaire dès la première cure. Nous avons mis en évidence à 3 semaines de l'anti-PD-1, une élévation précoce de la capacité de réserve respiratoire chez les patients présentant une réponse à l'immunothérapie tandis que les patients non-répondeurs ou en stabilité de la maladie ne présentent pas de modifications. De façon très intéressante, nous avons également identifié des modifications précoces du ratio OCR/ECAR dès un cycle d'anti-PD-1, à partir des PBMCs des patients et qui sont corrélées de manière linéaire et significative à la réponse tumorale à 6 mois ($p=0,045$).

Conclusion : L'évaluation du ratio OCR/ECAR à partir des PBMCs de patients pourrait facilement être réalisée en pratique clinique et être utilisée comme potentiel marqueur de réponse précoce aux anti-PD-1. En cas de validation de ces données, cela permettrait une adaptation thérapeutique rapide chez les patients non-répondeurs et ainsi augmenter les chances de survie. Il s'agirait d'une aide dans l'évaluation de nouveaux protocoles thérapeutiques, comme les combinaisons ou traitements séquentiels dans le mélanome, voire s'appliquer à d'autres types de cancers traités par anti-PD-1.

Composition du Jury :

Président : Professeur MORTIER Laurent

Assesseurs : Professeur STAUMONT-SALLÉ Delphine, Professeur MARCHETTI Philippe, Docteur CORAZAO-ROZAS Paola

Directeur de thèse : Professeur DELHEM Nadira