

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année 2022

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Comparaison des caractéristiques phénotypiques de
l'infiltrat lymphocytaire dans les cancers de l'ovaire
avancés : analyse exploratoire de données issues de
l'ascite *versus* carcinose péritonéale**

Présentée et soutenue publiquement le 20/05/2022
à 18 h au Pôle Formation

Par Solenn Le Guellec

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Nicolas PENEL

Assesseurs :

Madame le Docteur Stéphanie BECOURT

Madame le Docteur Camille PASQUESOONE

Madame le Docteur Delphine HUDRY

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Delphine HUDRY

Avertissement

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

Sigles

AUC	Air Under the Curve
BCR	B Cell Receptor
CG	Centre Germinatif
ChIP	Chimiothérapie IntraPéritonéale hyperthermique
CMF	Cytométrie en Flux
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité (ou HLA)
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
COSHG	Cancer de l'Ovaire Séreux de Haut Grade
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CTNA	Chimiothérapie Néoadjuvante
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
HRD	Homologous Recombination Deficient
HRP	Homologous Recombination Proficient
ICI	Inhibiteur de point de Contrôle Immunitaire
LT	Lymphocytes T
MET	Microenvironnement tumoral
MMR	MisMatch Repair
PARPi	Inhibiteur de Poly(ADP-Ribose) Polymérase
PCI	Peritoneal Cancer Index
SNV	Single Nucleotide Variant ou Variant mononucléotidique
SG	Survie Globale
SSP	Survie Sans Progression
SSR	Survie Sans Récidive
TALs	Lymphocytes associés aux tumeurs

TCGA The Cancer Genome Atlas
TCR T Cell Receptor
TILs Lymphocytes infiltrant la tumeur

Sommaire

Avertissement.....	2
Sigles.....	3
Sommaire	5
Introduction.....	7
1 Epidémiologie.....	7
2 Histologies.....	7
3 Tests génétiques :.....	8
4 Traitements de première ligne et de maintenance des cancers de l’ovaire avancés : 10	
4.1 La chimiothérapie	10
4.2 La chirurgie.....	10
4.3 Traitement de maintenance après une première ligne	11
5 L’immunothérapie dans les cancers de l’ovaire.....	14
5.1 Principe de l’immunoédition.....	14
5.2 Reconnaissance des antigènes tumoraux par les cellules de l’immunité	15
5.3 Cellules immunes composant le MET dans le COSHG.....	16
5.4 Micro-environnements au pluriel dans les COSHG – hétérogénéité inter- et intra-patientes	19
5.5 Modification du micro-environnement sous l’influence de la chimiothérapie	22
5.6 TILs et altérations génétiques	23
5.7 Principe de l’immunothérapie par inhibiteur de point de contrôle immunitaire	23
5.7.1 Marqueurs de réponse à l’immunothérapie.....	24
6 Vers les thérapies cellulaires lymphocytaires et au-delà	26
7 Ascite maligne dans les COSHG.....	28
7.1 Physiopathologie	28
7.2 L’ascite : un symptôme fréquent et de mauvais pronostic dans les cancers de l’ovaire.....	30
7.3 L’ascite maligne comme biopsie liquide ?	31
7.4 L’infiltration immune dans l’ascite maligne	32
Objectif de l’étude.....	34
Matériel et méthodes	35
1 Méthodologie de réalisation de la revue de la littérature	35

2	Méthodologie du projet exploratoire de TILSOV-1805.....	36
2.1	Conception de l'étude.....	36
2.2	Recueil et traitements des échantillons.....	36
2.3	Analyse des échantillons.....	38
2.4	Analyse de données.....	40
2.5	Analyses statistiques.....	43
2.6	Cadre réglementaire.....	44
	Résultats.....	45
1	Partie revue de la littérature.....	45
2	Partie projet ancillaire exploratoire TILSOV.....	45
2.1	Caractéristiques des patientes.....	45
2.2	Proportions des différentes populations lymphocytaires dans l'ascite en comparaison au péritoine au diagnostic.....	48
	Discussion.....	54
1	Principaux résultats.....	54
2	Discussion des résultats.....	54
3	Discussion de la méthode.....	56
4	Perspectives.....	58
	Conclusion.....	59
	Liste des tables.....	60
	Liste des figures.....	61
	Références.....	62
	Annexe 1 : stadification FIGO.....	71
	Annexe 2 – Article en cours de publication.....	72

Introduction

1 Epidémiologie

Le cancer de l'ovaire est le 8^{ème} cancer chez la femme en termes d'incidence avec 66 693 nouveaux cas en Europe en 2020 (5320 en France, 314 000 dans le monde), 5^{ème} en termes de mortalité avec 44053 décès en Europe en 2020 (3935 en France, 207 000 dans le monde) [1]. Les estimations pour 2040 prévoient 72 900 nouveaux cas par an et 51 800 décès en Europe. Le taux de survie à 5 ans tous stades confondus est de 43 % en France entre 2005 et 2010 [2]. Autour de 70-80 % des diagnostics se font cependant à un stade FIGO III/IV (la classification FIGO est rappelée en annexe) [3]. Le taux de survie à 5 ans est de 29 % pour les stades III et autour de 14 % pour les stades IV [4]. L'âge médian au diagnostic est de 65 ans.

2 Histologies

Le cancer de l'ovaire de type épithélial représente 90 % des cancers de l'ovaire [5]. Ils peuvent être subdivisés en plusieurs catégories (Figure 1) : carcinome séreux de haut grade (COSHG, 70%), carcinome à cellules claires (10-12 %), carcinome endométrioïde (10 %), carcinome séreux de bas grade (5%), carcinome mucineux (3-4 %), et de manière exceptionnelle : tumeur de Brenner maligne, adénocarcinome *mesonephric-like*, carcinome indifférencié, carcinosarcome, carcinome mixte.

Les carcinomes non épithéliaux comprennent : tumeurs mésenchymateuses, tumeurs des cordons sexuels, tumeurs germinales malignes et autres raretés.

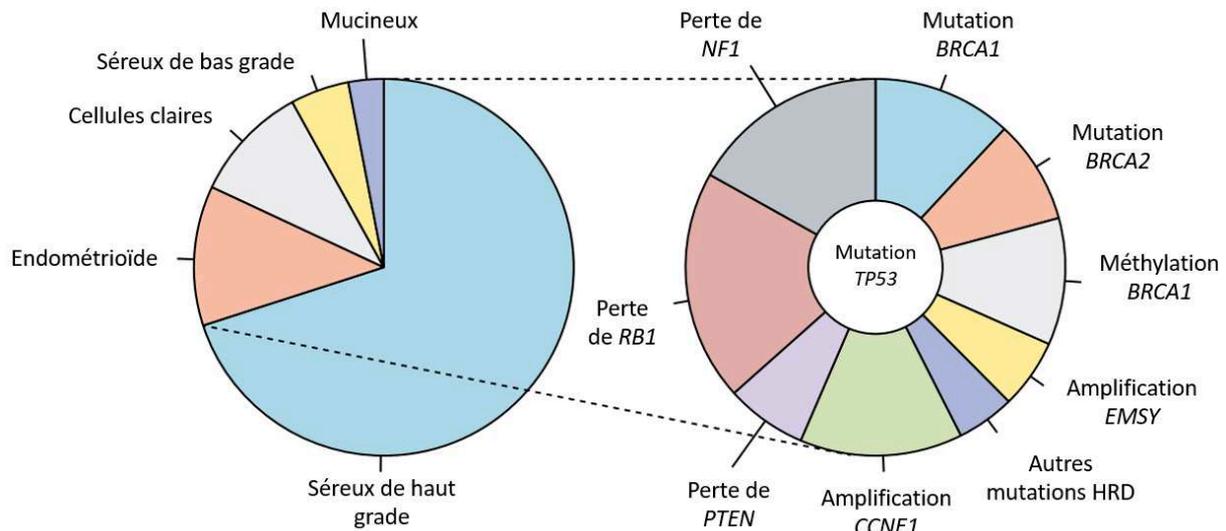


Figure 1. Sous-types histologiques des cancers épithéliaux de l'ovaire et caractéristiques moléculaires des COSHG d'après Lheureux et al. [6]

3 Tests génétiques :

Sur le plan constitutionnel : 15-30 % des femmes présentent des prédispositions génétiques [7], principalement représentées par les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (65-75 % des cas). L'histologie la plus fréquemment retrouvée chez ces femmes est le COSHG. Cinq à 10 % des formes familiales sont représentées par le syndrome de Lynch par altérations de la voie de réparation Mismatch Repair (MMR). Les histologies les plus fréquemment retrouvées chez ces femmes sont les carcinomes endométriïdes et les carcinomes à cellules claires [5]. D'autres gènes appartenant à la réparation de l'ADN par recombinaison homologue sont impliqués dans des formes familiales de cancers de l'ovaire. Le Groupe Génétique et Cancer recommande de réaliser un « panel de gènes sein/ovaire » contenant 13 gènes devant toute suspicion de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire [8].

Au niveau somatique, le consortium TCGA a étudié le profil mutationnel de 316 COSHG, le profil d'expression génique ainsi que la méthylation de l'ADN de 489 COSHG. Des mutations de *TP53* étaient retrouvées dans 96 % des cas, confirmées dans d'autres études [9]. Vingt pourcent des tumeurs étaient mutées *BRCA1* ou *2* en constitutionnel ou somatique et 11 % des tumeurs présentaient une hyperméthylation du promoteur de *BRCA1* éteignant ainsi son expression (mutuellement exclusif des mutations *BRCA1/2*). Les autres anomalies les plus fréquentes étaient : amplification ou mutation de *EMSY* (8 %), délétion focale ou mutation de *PTEN* (7 %),

hyperméthylation de *RAD51C* (3%), mutation de *ATM* ou *ATR* (2%), et mutation des gènes de l'anémie de Fanconi [9,10]. La moitié des tumeurs présentaient une déficience de la recombinaison homologue (HRD). Les mutations dans les gènes impliqués dans l'homéostasie du génome peuvent expliquer la fréquence d'altération du nombre de copies de plus ou moins grandes tailles (> 50 % des cas) avec notamment : une amplification des régions chromosomiques contenant *CCNE1*, *MYC* et *MECOM* dans plus de 20 % des cas, des délétions homozygotes de *PTEN*, *RB1* et *NF1*. L'amplification de *CCNE1* a été montrée par la suite comme étant mutuellement exclusive de l'altération de la voie *BRCA1/2* et associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie de première ligne [9]. Les voies de signalisation empruntées dans le développement tumoral étaient la voie *RB1* (67 % des cas), *RAS/PI3K* (45 % des cas) et *NOTCH* (22 % des cas). Enfin, l'analyse des signatures mutationnelles dans les cancers de l'ovaire retrouve 2 profils principaux : la signature 1B correspondant aux mutations induites par l'âge et la signature 3 correspondant aux mutations induites par l'altération de la voie *BRCA 1/2* [11]. Les autres signatures mutationnelles étaient plus rares et parfois non rattachées à une cause identifiée jusqu'alors [12].

Ces études moléculaires permettent à la fois de différencier les sous-types histologiques et d'identifier plusieurs catégories au sein même des COSHG. En effet les carcinomes mucineux, à cellules claires et endométrioïdes présentent des caractéristiques moléculaires propres. Au sein des COSHG il est possible d'identifier 4 clusters en fonction des profils d'expression génique : immunoréactif, prolifératif, différencié et mésenchymateux [10]. Les profils d'expression géniques peuvent aussi définir des groupes de bon et de mauvais pronostic. Le sous-groupe immunoréactif semble être de meilleur pronostic en comparaison aux autres [13].

La détermination de l'efficacité du système de recombinaison homologue est utile pour la prise en charge thérapeutique des cancers de l'ovaire. Le test myChoice® de Myriad Genetics est utilisé dans plusieurs essais thérapeutiques pour déterminer ce statut. Le test Myriad repose à la fois sur le séquençage des gènes *BRCA1/2* et sur la présence d'une instabilité génomique au sein des cellules tumorales. Des études académiques sont en cours pour développer des tests fonctionnels d'instabilité génomiques afin d'identifier ce statut HRD.

4 Traitements de première ligne et de maintenance des cancers de l'ovaire avancés :

4.1 La chimiothérapie

Le traitement de référence de la majorité des cancers de l'ovaire de type épithélial (COHG, carcinomes endométrioïdes, carcinosarcomes et carcinomes indifférenciés), de stade avancé repose sur l'association d'une chirurgie (d'exérèse tumorale complète) et d'une chimiothérapie. La chimiothérapie de référence est réalisée toutes les 3 semaines par Carboplatine AUC 5-6 + Paclitaxel 175 mg/m² [14] possiblement associée au Bévacizumab 15 mg/kg toutes les 3 semaines pour 22 cycles au total [15,16]. Un protocole hebdomadaire par Carboplatine AUC2 + Paclitaxel 60 mg/m² chez les femmes présentant des fragilités est possible selon les recommandations de Saint-Paul de Vence de 2021. Le nombre de cures au total est de 6 en cas de chirurgie première, 6-8 au total en cas de chirurgie intervallaire après 3-4 cures. En cas de chirurgie réalisée après 6 cures, ces recommandations proposent de poursuivre jusqu'à 8 cures de chimiothérapie.

4.2 La chirurgie

La chirurgie de référence repose sur une chirurgie de cytoréduction complète (CC0) [17,18]. La chirurgie « minimale » comprend : une hystérectomie totale avec annexectomie bilatérale, une omentectomie totale, une appendicectomie, une cytologie et des biopsies péritonéales multiples. Pour obtenir une résection complète, il est parfois nécessaire de réaliser des résections digestives (iléales, coliques ou rectales) avec ou sans stomie transitoire, une cholécystectomie, une splénectomie, des résections péritonéales étendues, des curages ganglionnaires. L'évaluation initiale de l'extension de la maladie se fait par le score d'extension de la carcinose péritonéale ou score de Sugarbaker, ou PCI pour *peritoneal carcinoma index* [19]. Ce score est la somme des scores d'extension attribués à 13 régions abdomino-pelviennes. Il varie entre 0 (pas d'atteinte péritonéale) et 39 (atteinte péritonéale étendue dans toutes les régions). Il aide au choix entre une chirurgie première ou une CTNA. En cas de maladie étendue ne permettant pas *a priori* une résection CC0 d'emblée, une CTNA sera proposée pour 3 cycles avant une réévaluation. L'analyse

poolée des études EORTC 55971 et CHORUS montre une amélioration de la SG chez les patientes présentant une maladie FIGO IV quand elles sont traitées par CTNA [20].

Dans les Hauts de France, il existe une surmortalité par cancer de l'ovaire de 12 % par rapport à la moyenne de la France métropolitaine (Lapotre-Ledoux 2019). Une étude récente de vie réelle réalisée au Centre Oscar Lambret montre que pour 62 % des patientes, l'extension initiale de la maladie a nécessité une CTNA avant une prise en charge chirurgicale et seulement 38 % des patientes sont opérées d'emblée [21]. Le PCI médian lors de la prise en charge chirurgicale était de 10. Il existait une différence de qualité de résection entre le groupe chirurgie première avec 97.6 % de chirurgie CC0 et le groupe CTNA avec 80 % de chirurgie CC0 ($p=0.001$). Dans le groupe chirurgie première, une résection intestinale était réalisée plus fréquemment que dans le groupe CTNA (56 % vs 34.9 %, $p=0.002$). Il n'y avait pas de différence en termes de complication chirurgicale entre les 2 groupes. La caractéristique majeure permettant de différencier ces 2 groupes est la charge tumorale initiale, évaluée par le PCI. La charge tumorale initiale est un argument pour décider de réaliser une CTNA tout comme d'autres facteurs : âge, fragilité, comorbidités, état nutritionnel, morbidité du geste prédite, choix des patientes.

La chimiothérapie intrapéritonéale hyperthermique (ChIP) par Cisplatine 100 mg/m² associée à du thiosulfate est proposée à la patiente en cas de chirurgie complète ou avec résidu de < 1 cm après 3 cures de CTNA [22]. Dans l'étude OVHIPEC de Van Driel *et al.* de 2018 [23], l'utilisation de la ChIP améliorait la survie sans récurrence (SSR) médiane, passant de 10.7 mois sans ChIP à 14.2 mois avec ChIP et la survie globale (SG) médiane avec 33.9 mois sans ChIP vs 45.7 mois avec ChIP. Il n'y a cependant pas de données sur l'utilisation du Bévacicumab intraveineux après cette procédure. Les indications de la ChIP pourraient s'étendre à la chirurgie première. Cette stratégie est actuellement évaluée dans le cadre de l'étude CHIPPI-1808 et OVHIPEC-2 [24,25].

4.3 Traitement de maintenance après une première ligne

Selon les recommandations de Saint-Paul de Vence 2021, en l'absence de contre-indication, une maintenance est réalisée par inhibiteurs de PARP (PARPi) et/ou Bévacicumab. Les PARP sont des enzymes impliquées dans la réparation des cassures simples brins de l'ADN. Leur inhibition entraîne des cassures simples brins

et en l'absence de recombinaison homologue efficace, une instabilité génomique. La létalité synthétique définit la synergie entre l'altération de la réparation des cassures simples brins par les PARPi et l'absence de réparation par recombinaison homologue intrinsèque à certaines tumeurs.

L'Olaparib est un PARPi qui peut être prescrit à la posologie de 300 mg 2/jour chez les patientes ayant reçu une chirurgie première ou d'intervalle et une chimiothérapie par Carboplatine-Paclitaxel en réponse complète ou partielle et porteuse d'une mutation *BRCA* constitutionnelle ou somatique. La durée maximale du traitement est de 2 ans en cas de réponse complète. Dans l'étude SOLO1 [26,27] cette maintenance améliorait la survie sans progression (SSP) passant de 13,8 mois dans le groupe placebo à 56,0 mois dans le groupe Olaparib (HR = 0,33 ; 95% IC : 0,25-0,43). L'essai PAOLA-1 [28], montrait un bénéfice en SSP de l'ajout d'Olaparib au Bévacicumab chez les patientes suivies pour un carcinome de haut grade FIGO III ou IV, après chirurgie première ou d'intervalle et chimiothérapie par Carboplatine-Paclitaxel-Bévacicumab en réponse complète ou partielle. Toutes patientes confondues, cela améliorait la SSP, passant de 16,6 mois dans le groupe Bévacicumab seul à 22,1 mois dans le groupe Olaparib + Bévacicumab (HR = 0,59 ; 95% IC : 0,49-0,72). Le bénéfice était plus important chez les patientes porteuses d'une mutation *BRCA* avec une SSP médiane de 37,2 mois dans le groupe association contre 21,7 mois dans le groupe Bévacicumab seul (HR=0,31, 95% IC : 0,20-0,47). Le bénéfice était aussi présent chez les patientes HRD non *BRCA* mutées (identifiées par le test Myriad) avec une SSP de 28,1 mois dans le groupe association vs 16,6 mois dans le groupe Bévacicumab seul (HR=0,43 ; 95% IC : 0,25-0,45). Les patientes ayant un test HRP ou non connu ne tiraient pas de bénéfice de l'association. Suite à cet essai, l'Olaparib peut être associé au Bévacicumab chez les patientes porteuses d'une mutation *BRCA* constitutionnelle ou somatique, ou HRD.

L'étude PRIMA [29] portait sur des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire de stade FIGO III avec résidu tumoral après chirurgie ou inopérable, de stade FIGO IV ou des patientes nécessitant de la CTNA. Cette étude a montré un bénéfice en SSP chez les patientes recevant du Niraparib en comparaison au placebo avec une SSP médiane de 13,8 mois vs 8,2 mois dans l'ensemble de la population (HR=0,62 ; 95 % IC : 0,50-0,76). Chez les patientes HRD (identifiées par le test Myriad® et comprenant les patientes *BRCA* mutées) la SSP médiane était de 21,9 mois dans le groupe

Niraparib contre 10,4 mois dans le groupe placebo (HR=0,43 ; 95 % IC : 0,31-0,59). Dans le groupe HRP, la SSP médiane était de 8,1 mois dans le groupe Niraparib vs 5,4 mois dans le groupe placebo (HR=0,68 ; 95% IC : 0,49-0,94). À noter que le groupe contrôle n'était pas traité par Bévacicumab car ce traitement n'était pas autorisé dans tous les pays participant à l'étude. Le Niraparib peut être prescrit chez les patientes suivies pour un carcinome de haut grade de stade FIGO III ou IV après chirurgie première ou d'intervalle non éligible au Bévacicumab en réponse complète ou partielle suite à la chimiothérapie.

L'utilisation d'un PARPi en association avec la chimiothérapie à base de platines a été testée par l'essai VELIA [30]. Cette étude concernait les patientes atteintes d'un COSHG de stade III ou IV traitées par chirurgie première ou d'intervalle et traitées par Carboplatine-Paclitaxel. Les patientes étaient randomisées dans 3 groupes : placebo en association avec la CT puis placebo en maintenance ; veliparib en association avec la CT puis placebo en maintenance ; veliparib en association avec la CT puis veliparib en maintenance (veliparib tout du long). Cette étude montrait un bénéfice en SSP dans le groupe veliparib tout du long avec une SSP médiane de 23,5 mois vs 17,3 mois dans le groupe placebo (HR=0,68 ; 95 % IC : 0,56-0,83). Le bénéfice était plus marqué dans le groupe de patientes porteuses d'une mutation *BRCA* constitutionnelle ou tumorale avec une SSP médiane de 34,7 mois contre 22,0 mois (HR=0,44 ; 95 % IC : 0,28-0,68) et dans le groupe HRD 31,9 mois contre 20,5 mois (HR=0,57 ; 95 % IC : 0,43-0,76). Cependant ce traitement n'a pas d'AMM ni d'ATU, il n'y a donc à ce jour pas d'association entre PARPi et chimiothérapie.

La Figure 2 résume la stratégie de maintenance. Elle tient compte des contre-indications au Bévacicumab, de la présence ou non de mutations *BRCA* et du statut HRD/HRP.

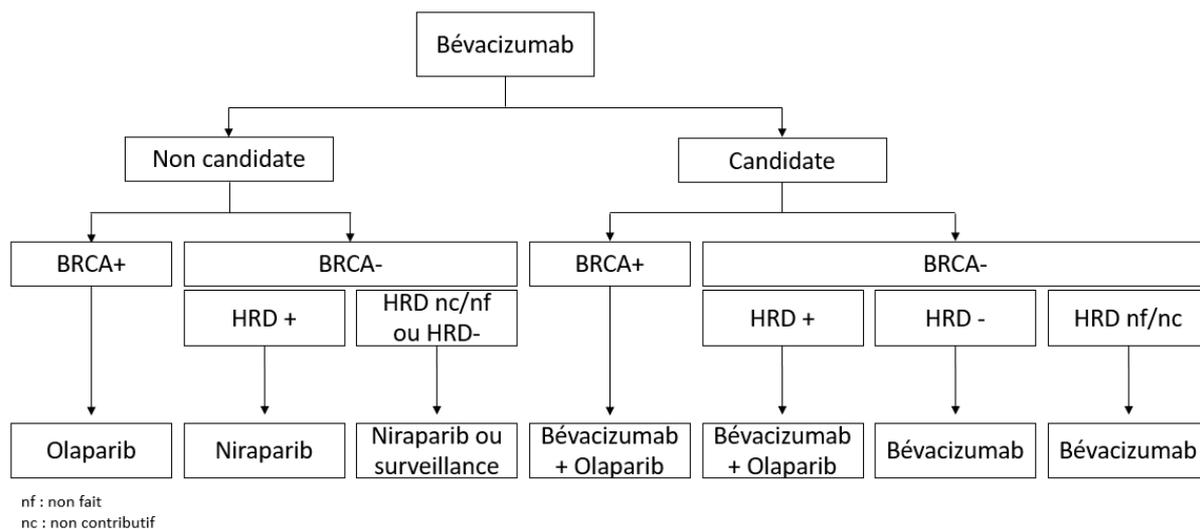


Figure 2. Algorithme décisionnel sur la maintenance après une première ligne de chimiothérapie d’après les recommandations de St Paul de Vence 2021.

Malgré l’amélioration de la prise en charge par chirurgie et chimiothérapie, 75 à 80 % des patientes en rémission complète après ces traitements récidiveront dans les 2 ans suivant la fin des traitements [31]. Ces données ne tiennent cependant pas compte des avancées thérapeutiques récentes concernant les PARPi et de nouvelles études devront préciser ce risque à la lumière des avancées thérapeutiques récentes.

Parmi les patientes recevant de la CTNA, près de 30 % ne seront finalement pas opérées [32], en partie du fait d’une mauvaise réponse à la chimiothérapie. Du fait de ces résultats cliniques, il est essentiel de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patientes ainsi que des biomarqueurs de réponse à ces nouveaux traitements.

5 L’immunothérapie dans les cancers de l’ovaire

Devant la révolution de l’immunothérapie par inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICI) dans de nombreux cancers (poumon, mélanome, rein, vessie…), ces thérapeutiques ont aussi été évaluées dans les cancers de l’ovaire, avec des résultats moins spectaculaires.

5.1 Principe de l’immunoédition

L’immunoédition est, de manière simplifiée, la capacité du système immunitaire à reconnaître les cellules tumorales. Cette interaction peut avoir 3 conséquences : entraîner l’élimination des cellules tumorales en faisant intervenir l’immunité innée et

adaptative (immunosurveillance), établir un équilibre dynamique où se jouent des mécanismes de pression de sélection immune et enfin favoriser l'échappement immunitaire par la sélection des clones les moins immunogènes [33].

Ce concept d'immunoédition, d'interaction entre cellules immunitaires et cellules tumorales est à la base du développement des immunothérapies utilisées actuellement dans les cancers solides. Afin d'appréhender la réponse à ces traitements et de comprendre les limites de l'immunothérapie dans les cancers de l'ovaire, il est nécessaire de s'intéresser au micro-environnement tumoral (MET).

5.2 Reconnaissance des antigènes tumoraux par les cellules de l'immunité

Les antigènes reconnus par les cellules immunitaires tous cancers confondus sont de 4 types :

- Les néoantigènes (créés par les altérations génétiques et notamment les mutations des séquences codantes, les fusions).
- Les « Cancer Testis Antigens » (antigènes exprimés durant l'embryogenèse puis éteints par méthylation d'îlots CpG et réactivés dans un contexte de néoplasie par modification de l'épigénome).
- Les antigènes retrouvés dans des tissus normaux et surexprimés dans des cancers.
- Les antigènes provenant d'agents pathogènes à l'origine de la néoplasie.

Ces antigènes vont être présentés aux cellules de l'immunité par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : les cellules dendritiques, *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou HLA) de type I et II. Les allotypes HLA vont présenter des peptides propres à leurs caractéristiques d'ancrage. Ainsi, selon l'allotype HLA, un même peptide sera présenté par les CPA de manière différente entre deux individus. Les « T Cell Receptor » ou TCR sont composés de chaînes α et β à la surface des lymphocytes T (identifiés par le CD3+) et reconnaissent les antigènes tumoraux. Les LT n'ayant pas encore rencontré un antigène sont appelés LT naïfs. Ils expriment le CD45RA.

Le TCR reconnaît un antigène lorsqu'il est présenté sous forme d'épitope par le CMH. Le ligand reconnu est composé à la fois des acides aminés composant les

molécules du CMH ainsi que des acides aminés composant l'épitope. Cette capacité de présentation des peptides par le CMH et de reconnaissance par les TCR a été modélisée par l'outil de bio-informatique PRIME [34]. L'étude rapportant l'utilisation de cet outil bio-informatique est passionnante. PRIME combine à la fois des données de présentation des néoépitopes (synthétisés suite à l'apparition de mutations somatiques dans les cellules tumorales) par le CMH et leur reconnaissance par les TCR. Il a permis d'identifier les acides aminés aromatiques et hydrophobes comme les plus à même d'être reconnus au niveau des TCR et donc d'identifier les néoépitopes les plus immunogènes. Cet outil PRIME a été couplé à la base de données TCGA. Il est alors possible d'étudier le profil des néoépitopes créés par les mutations somatiques des cellules tumorales. L'étude de Schmidt *et al.* [34] a ainsi montré que les mutations les plus fréquemment retrouvées dans les cancers sont moins présentes chez les patients dont les mutations donneraient des néoépitopes immunogènes. Ceci est une démonstration par la bio-informatique des mécanismes de pression immune. Au total, l'immunoédition est spécifique de chaque allotype HLA et dessine le profil mutationnel des cellules tumorales.

5.3 Cellules immunes composant le MET dans le COSHG

Après rencontre avec un antigène, les lymphocytes vont exprimer le CD45RO, identifiant les LT mémoires. L'activation des LT CD8⁺ et la réponse cytotoxique nécessitent à la fois cette reconnaissance antigénique et l'interaction des molécules de co-stimulation avec leur ligand (OX40/OX40L, CD28/CD80 et C28/CD86) comme représenté dans la Figure 3. Les lymphocytes T CD8⁺ vont alors s'activer et adopter une réponse cytotoxique par sécrétion d'enzymes et de cytotoxines ou par contact direct avec les cellules tumorales. En réponse à cette activation, des molécules de co-stimulation inhibitrices apparaissent sur les lymphocytes (PD1, CTLA4, TIM3, LAG3) et les cellules tumorales (PD-L1, PD-L2, CD80, CD86) induisant l'épuisement lymphocytaire et la perte de leur capacité de réponse cytotoxique et de sécrétion cytokinique. Ces molécules de co-stimulation inhibitrice sont les cibles actuelles des immunothérapies.

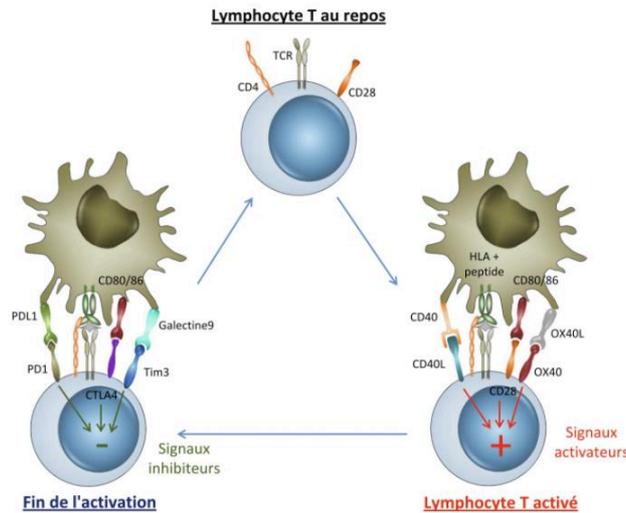


Figure 3. Expression de molécules activatrices et inhibitrices au cours de l'activation du lymphocyte T tiré du livre « Immunologie fondamentale et immunopathologie » [35].

Les cellules NK ont également un rôle cytotoxique. Elles sont identifiées par l'expression du CD56, du CD16 et l'absence du CD3. Leur activité cytotoxique se fait par contact direct avec les cellules tumorales ou par dégranulation. Elles sont à l'interface entre l'immunité innée et adaptative en favorisant la maturation des cellules dendritiques et en orientant la polarisation des LT CD4+.

Les cellules NKT expriment à la fois des TCR et des récepteurs spécifiques aux cellules NK. Elles sécrètent de l'IFN γ responsable du recrutement des LT CD8+ effecteurs et des cellules NK favorisant ainsi la réponse cytotoxique antitumorale. Les cellules NKT expriment à la fois le CD3, le CD56 et le CD16.

Les lymphocytes T régulateurs (CD4+ CD25+ FoxP3+) ont un rôle freinateur sur les LT effecteurs par la sécrétion de TGF β et d'IL-10. Ils jouent un rôle essentiel dans l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. À noter que les cellules tumorales sécrètent elles aussi de l'IL-10 et du TGF β favorisant la polarisation des LT naïfs en LT régulateurs.

Les lymphocytes T auxiliaires ou « helper » (LTh) sont des LT CD4+ différenciés [35,36]. La polarisation en Th1, Th2 ou Th17 se fait en fonction des antigènes et des cytokines présents dans le MET (Figure 4). Les Th1 se différencient sous l'influence de l'IL-2, l'IL-12, l'IFN γ et du TNF α sécrétés entre autres par les LT CD8+ et soutiennent la réponse cytotoxique antitumorale médiée par les LT CD8+. Les Th2 se différencient sous l'influence de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10. Le développement des Th1 et des Th2 est mutuellement antagoniste : l'IFN γ sécrété par les cellules Th1

inhibe la polarisation en Th2 et l'IL-4 sécrétée par les cellules Th2 bloque la polarisation en Th1. Outre cette dichotomie historique, les LT CD4+ peuvent se différencier en cellules Th17 sous l'influence de l'IL-6 et du TGFβ. Les LTh17 sécrètent de l'IL-17 notamment. Ces cellules sont plastiques et peuvent se convertir en cellules Th1 et ainsi sécréter de l'IFNγ en perdant la capacité de sécréter l'IL-17. Ce phénotype Th1 « non classique » se distingue des Th1 classiques par l'expression du CD161. Ce changement se fait sous l'influence continue de l'IL-12. Leur rôle dans la progression tumorale est soumis à controverse et reste à éclaircir [37]. Les cellules Th17 sembleraient avoir un rôle régulateur ou pro-inflammatoire en fonction des stimuli du MET. La présence de cellules Th17 a été décrite dans les cancers de l'ovaire avec une proportion supérieure dans les stades précoces et présentait une corrélation négative avec les LT CD4+ régulateurs [38].

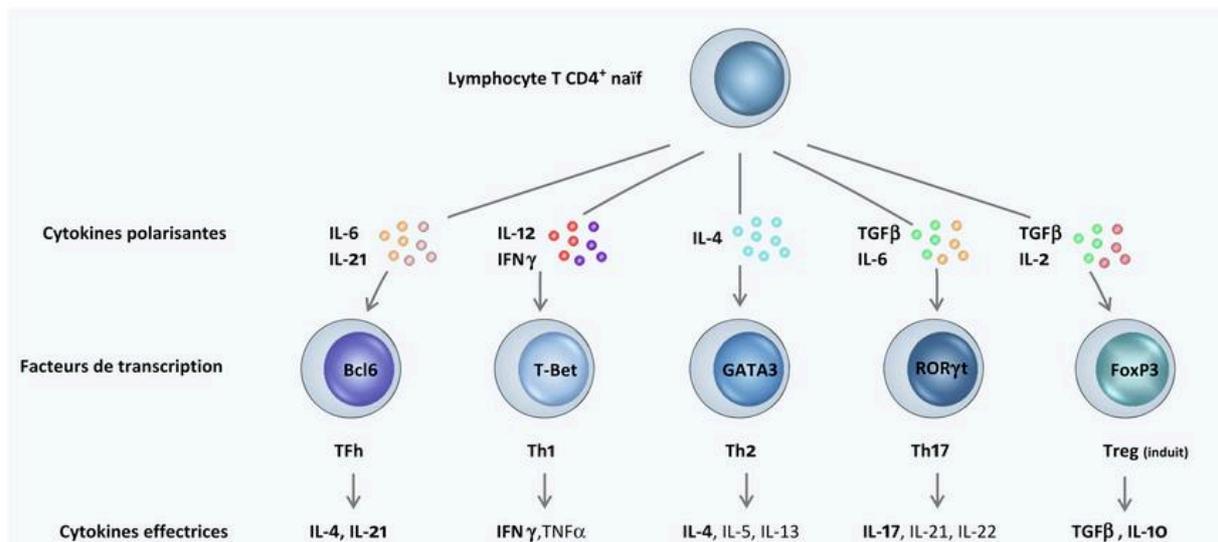


Figure 4. Polarisation des LT tiré du livre « Immunologie fondamentale et immunopathologie » [35]

Les lymphocytes B (LB) expriment le CD19 et le CD20 et reconnaissent les antigènes via le B Cell Receptor (BCR). Après rencontre avec un antigène, les LB naïfs se différencient en plasmocytes (CD38+) dans les tissus ou forment les centres germinatifs (CG) où se déroulent les hypermutations somatiques (afin d'obtenir des anticorps plus affins) et les commutations isotypiques (permettant de changer les classes d'immunoglobulines) [35]. Les cellules formées dans ces CG se différencient en cellules B mémoires (CD27+) ou en plasmocytes à longue durée de vie.

Les LT CD4+ se différencient en lymphocytes T folliculaires auxiliaires ou T folliculaires « helper » (TFH) sous l'influence des cellules dendritiques et par

l'expression du facteur de transcription Bcl6 [39]. L'IL-2 inhibe cette différenciation en induisant l'expression de Blimp-1, un régulateur négatif de la différenciation en lymphocytes TFH. Ces cellules sont nécessaires à la prolifération et la différenciation des LB naïfs en LB mémoires et en plasmocytes.

La valeur pronostique de l'infiltrat immun tumoral dans les cancers de l'ovaire a été beaucoup discutée au cours du temps. La méta-analyse dirigée par l'équipe de Coukos en 2012 [40] a montré que 60 % des prélèvements présentaient des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) intraépithéliaux. La présence de TILs est associée à un meilleur pronostic. Zhang *et al.* rapportaient en 2003 que la SG à 5 ans des patientes ayant une infiltration en TILs (identifiés par l'expression du CD3) intraépithéliaux était de 38 % contre 4.5 % chez les patientes n'ayant pas de TILs [41]. Le rôle de chaque sous-population de TILs peut être variable d'une étude à une autre. La présence de LT régulateurs est globalement de meilleur pronostic que leur absence. Ceci reflète sans doute la valeur pronostique positive de l'infiltration lymphocytaire globale. L'accumulation de LT régulateurs semble cependant de mauvais pronostic [42] et l'étude du ratio CD8+/CD4+ régulateurs appuie cette observation [43,44]. Les lymphocytes T CD4+ mémoires auraient davantage un rôle antitumoral favorisant une meilleure survie. Dans de nombreuses études, l'infiltrat tumoral par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et l'augmentation du ratio CD8+/CD4+ sont associés à une meilleure survie [40].

Ce champ d'étude est en pleine expansion avec la mise en lumière du rôle d'autres types cellulaires présents dans le MET : fibroblastes associés au cancer, macrophages associés aux tumeurs, lymphocytes non conventionnels comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ [45].

5.4 Micro-environnements au pluriel dans les COSHG – hétérogénéité inter- et intra-patientes

Le COSHG est un excellent modèle pour étudier l'hétérogénéité du MET et la phylogénie tumorale entre plusieurs sites métastatiques, avant ou après chimiothérapie. En effet, comme nous l'avons vu, le traitement des COSHG est basé sur la chirurgie, première ou d'intervalle, ce qui permet d'étudier l'ensemble des sites métastatiques péritonéaux d'une même patiente.

Cette hétérogénéité intra et inter-patiente a été rapportée par Zhang *et al.* chez 38 patientes à partir de 212 échantillons obtenus par chirurgie de cytoréduction [46]. Les échantillons ont été étudiés par Whole Genome Sequencing, IHC, séquençage des TCR et des BCR et RNA-seq. Cette étude est un exemple de l'apport du séquençage haut débit et des analyses bio-informatiques à la compréhension du MET. Elle a permis d'identifier 3 catégories de micro-environnements : faiblement infiltrés en TILs (N-MET), majoritairement infiltrés en TILs stromaux (S-MET), équilibre des TILs stromaux et épithéliaux (ES-MET). Les profils d'expression génique de ces 3 sous-types leur étaient propres. Parmi ces patientes, 14/31 ne présentaient qu'un seul type de micro-environnement parmi les différents échantillons et 17/31 patientes présentaient 2 voire les 3 catégories de MET montrant ainsi une grande variabilité intra et inter-patientes.

Par des études spatiales de colocalisation des TILs et des cellules tumorales Zhang *et al.* [46] ont montré que les TILs présents dans le stroma semblaient peu interagir avec les cellules tumorales, a contrario des TILs intraépithéliaux. Afin de déterminer s'il existe un lien entre catégorie de MET et répartition des clones tumoraux, ils ont réalisé des études de lignage des cellules tumorales par profilage de variants mononucléotidiques (SNV), de nombre de copies alléliques et de réarrangements géniques des cellules tumorales au sein des 3 catégories de MET. La catégorie ES-MET présentait une hétérogénéité intratumorale faible en comparaison aux autres MET. D'une même façon, les échantillons ayant une diversité de clones tumoraux la plus faible étaient fortement infiltrés par les LT CD8+. Au total, l'abondance de TILs épithéliaux était négativement corrélée à la diversité de clones tumoraux.

Ceci suggère que les sous-clones tumoraux exprimant des néoantigènes supplémentaires par rapport aux clones parentaux ont plus de chance d'être éliminés par les TILs. Pour tester cette hypothèse, ils ont utilisé des outils de bio-informatique afin de prédire les néoantigènes créés par les SNV. De plus, à l'aide d'outils de phylogénie, ils ont déterminé le moment d'apparition de ces néoantigènes. De cette façon, ils ont montré que les échantillons riches en LT CD8+ étaient associés à une élimination des clones tumoraux présentant des néoantigènes sous clonaux participant à la purification de la diversité tumorale par les TILs. Il n'y avait pas de

corrélation entre les TILs stromaux et la déplétion en néoantigènes clonaux ou sous clonaux.

En réponse à cette immunoédition, certains clones tumoraux échappent au système immunitaire par la perte de l'hétérozygotie HLA. Ce mécanisme d'échappement à la pression immunitaire a également été observé dans d'autres cancers, chez les patients de la cohorte TRACER X [47]. La perte d'hétérozygotie des gènes HLA est associée à une densité augmentée en TILs. La question qui s'est alors posée est de savoir si un clonotype de TCR est associé à un clone tumoral.

Le séquençage ARN des TCR et des BCR permet d'étudier la variabilité intrapatient des TILs entre différents sites métastatiques et leur suivi en lien avec les clones tumoraux. Dans l'étude de Zhang *et al.*, il y avait bien une corrélation entre la similarité des TCR et la similarité des clones tumoraux chez 7/13 patientes. Cette observation était plus marquée chez les patients ayant une densité élevée de LT CD8+. Une hypothèse est que les clonotypes de TILs suivent à la trace les clones tumoraux. Il n'y avait pas de corrélation entre similarité de BCR et clones tumoraux suggérant que cette filature des clones tumoraux est réservée aux cellules T.

De nombreuses avancées ont été apportées à la compréhension des mécanismes d'échappement au système immunitaire par la cohorte TRACER X [47]. Chez ces patients atteints de cancer du poumon et de carcinomes rénaux à cellules claires, 2 mécanismes principaux d'échappement au système immunitaire ont été observés : la baisse du nombre de néoantigènes et l'altération de la machinerie de présentation des néoantigènes par le CMH. La baisse du nombre de néoantigènes pouvait passer par 4 mécanismes : l'altération du nombre de copies géniques, la répression transcriptionnelle, l'hyperméthylation des promoteurs des gènes codant les néoantigènes et l'élimination des clones immunogènes par les cellules T. L'altération de la machinerie de présentation des néoantigènes par le CMH passait par la perte d'hétérozygotie des gènes HLA ou des mutations dans ces gènes [47]. Tous ces mécanismes n'ont pas encore été étudiés dans les cancers de l'ovaire.

5.5 Modification du micro-environnement sous l'influence de la chimiothérapie

Comme vu précédemment, la chimiothérapie à base de platines et de taxanes fait partie du traitement de référence dans les cancers de l'ovaire avancés. Il est donc essentiel d'étudier l'évolution des TILs avant et après chimiothérapie pour avoir un aperçu de l'évolution du MET au cours de l'évolution de la maladie.

Les TILs présentent une grande variabilité inter et intra-patientes dans les différentes études. Une manière permettant de prendre en compte cette variabilité est de comparer un même site métastatique avant et après CTNA. Jiménez-Sánchez *et al.* [48] ont comparé les profils transcriptionnels de 38 sites tumoraux avant et après chimiothérapie. Les profils transcriptionnels ont été catégorisés par voies de signalisation. Avant chimiothérapie, l'expression génique était en majorité celle des voies oncogéniques. Après chimiothérapie, ces mêmes sites métastatiques présentaient une augmentation de l'expression des gènes en lien avec l'immunité. La proportion de cellules NK augmentait après CTNA sans modification des autres populations lymphocytaires. Le séquençage des TCR retrouvait une expansion oligoclonale après CTNA entre sites métastatiques identiques. D'autres études retrouvent une augmentation de la proportion de LT CD8+ et du ratio CD8+/CD4+ après CTNA [49,50].

Plus le ratio effecteurs sur régulateurs est élevé, meilleur est le pronostic [49]. De même, l'équipe de Bohm *et al.* retrouvait une baisse plus importante des LT régulateurs chez les patientes bonnes répondeuses à la chimiothérapie en comparaison aux patientes répondant moins bien à la CTNA [51]. Les patientes bonnes répondeuses avaient une augmentation du profil d'expression Th1. D'autre part, plusieurs études retrouvent une augmentation de l'expression de PD-L1 sous CTNA [51,52].

Ces résultats suggèrent que la chimiothérapie par platines et taxanes induit le passage d'un MET régulateur immunosuppresseur à une réponse cytotoxique antitumorale. Cette réponse cytotoxique passe par une expansion oligoclonale des LT. En réponse, l'expression de PD-L1 par les cellules immunes et tumorales augmente.

5.6 TILs et altérations génétiques

Les altérations génétiques dans les cancers de l'ovaire concernent plusieurs gènes et voies de réparation de l'ADN : la voie du « mismatch repair » et la voie de la recombinaison homologue en particulier. L'altération de ces voies de réparation de l'ADN conduit à une augmentation de la charge mutationnelle des tumeurs et à une augmentation de l'expression de néoantigènes [53,54].

En conséquence, les tumeurs *BRCA* mutées et HRD sont riches en TILs [55]. Strickland *et al.* [53] ont montré qu'il y avait plus de CD3+ et de CD8+ dans les tumeurs *BRCA* mutées que dans les tumeurs HRP. Il n'y avait pas de différence concernant les CD4+ dans cette étude. Ils ont également observé une augmentation de l'expression de PD1 sur les lymphocytes et de PD-L1 sur les cellules immunes dans les tumeurs *BRCA* mutées en comparaison aux tumeurs HRP.

Concernant les anomalies du système MMR, Xiao *et al.* [56] retrouvent une proportion plus importante de CD3+ et de CD8+ dans les tumeurs avec une perte d'expression des protéines MMR en comparaison aux tumeurs ayant une conservation de l'expression de ces protéines. La principale explication est là aussi l'augmentation des néoantigènes induits par l'augmentation de l'instabilité génomique. L'étude du MET dans les cancers de l'ovaire MSI est cependant rendue difficile par leur fréquence faible.

5.7 Principe de l'immunothérapie par inhibiteur de point de contrôle immunitaire

Les immunothérapies par anticorps anti-PD1, anti-PDL1, anti-CTLA4 inhibent l'interaction des molécules de co-stimulation inhibitrice et rétablissent l'activité antitumorale des lymphocytes. Cette réponse n'est donc pas une réponse immunitaire *de novo*, mais rétablit la réponse immunitaire préexistante. Cela nécessite une infiltration préexistante des tumeurs par des TILs. La réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI) sera d'autant plus importante que le répertoire de TCR sera clonal [57].

5.7.1 Marqueurs de réponse à l'immunothérapie

L'Immuno Oncology Handbook de l'ESMO répertorie 3 biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie [58] :

- L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et cellules immunes en immunohistochimie.
- La charge mutationnelle tumorale reflétant les néoantigènes, avec la difficulté de définir le seuil qualifiant une haute charge mutationnelle, variable en fonction du primitif [59].
- L'infiltration par cellules de l'inflammation : CD3+, CD8+, macrophages, cellules régulatrices.

Les essais d'immunothérapie en première ligne sont peu satisfaisants. L'étude JAVELIN 100, par exemple, évaluant l'ajout de l'Avelumab à la chimiothérapie par Carboplatine-Paclitaxel, a été arrêté pour futilité [60]. L'étude IMAGYN 050 évalue l'ajout de l'Atezolizumab à un traitement par Carboplatine, Paclitaxel et Bévacicumab [61]. La PFS médiane dans la population en intention de traiter est de 19,5 mois dans le groupe Atezolizumab et 18,4 mois dans le groupe placebo (HR = 0,92, IC 95 % : 0,79-1,07). La PFS médiane dans le groupe PD-L1 > 1% était de 20,8 mois dans le groupe Atezolizumab et de 18,5 mois dans le groupe placebo (HR = 0.80, IC 95 % : 0,65-0,99, p=0.038). Les données de SG ne sont pas encore disponibles. Comme vu précédemment, le MET s'enrichit en LT CD8+ cytotoxique et l'expression de PD-L1 augmente sous CTNA. Il est donc intéressant d'étudier la place de l'immunothérapie dans le cancer de l'ovaire prétraité.

Zhu *et al.* [62] ont conduit une méta-analyse à partir de 15 études utilisant des inhibiteurs de PD1 ou PD-L1 seuls ou en association en cas de récurrence de cancer de l'ovaire. Le taux de réponse globale s'étend de 4 à 48 %, avec un taux de réponse toutes études confondues à 19 %. La résistance aux platines ne semblait pas influencer ce taux. L'hétérogénéité de réponse aux ICI pouvait s'expliquer par l'utilisation des ICI en monothérapie ou en combinaison. En cas de traitement par ICI (Pembrolizumab, Avelumab, Atezolizumab, Nivolumab), le taux de réponse globale était de 9 % (IC 95 % : 7-12 %).

Une des hypothèses avancées dans la littérature pour expliquer ce faible taux est la faible charge mutationnelle (autour de 3,6/Mb) dans les cancers de l'ovaire

[59,63]. Cependant, dans les cancers de l'ovaire, cette charge mutationnelle et le nombre de néoantigènes ne semblent pas corrélés à l'infiltration en LT CD8+ [64]. Cette hypothèse n'est donc pas suffisante. De plus, malgré la faible charge mutationnelle, Bobisse *et al.* ont mis en évidence des LT CD8+ reconnaissant spécifiquement de néoantigènes tumoraux dans la plupart des cancers de l'ovaire étudiés par des méthodes d'enrichissement des LT oligoclonaux [65]. Ceci suggère que malgré l'absence de réaction immune antitumorale dans certaines tumeurs, ces tumeurs ont une infiltration en TILs reconnaissant les cellules tumorales, alimentant l'espoir envers les thérapies cellulaires. Concernant l'utilisation de l'expression de PD-L1 comme biomarqueur, il existe des données discordantes sur l'efficacité des immunothérapies en fonction de ce biomarqueur. Ceci peut être expliqué en partie par l'absence d'homogénéité dans les techniques et les seuils utilisés [66–69].

Comme vu précédemment, la chimiothérapie modifie le MET en induisant une augmentation du ratio CD8+/CD4+, une augmentation de la réponse cytotoxique des TILs et une augmentation de l'expression de PD-L1. Une piste intéressante semblait donc être l'association des ICI à la chimiothérapie. La méta-analyse conduite par Zhu *et al.* [62] retrouve un taux de réponse globale en cas de combinaison d'un ICI avec une chimiothérapie de 36% (IC 95 % : 24-51 %). Les études étaient hétérogènes, utilisant des chimiothérapies diverses (Doxorubicine liposomale pégylée, Cisplatine associée à la Gemcitabine, Cyclophosphamide).

Le rationnel de l'utilisation du cyclophosphamide dans ce contexte repose sur ses propriétés alkylantes et donc d'altération de l'ADN ainsi qu'immunomodulatrice. Le cyclophosphamide réduit de la tolérance immunitaire en abaissant les cellules T régulatrices, en restaurant les fonctions effectrices des TILs et des cellules NK, et en maintenant une homéostasie permettant le bon fonctionnement des cellules dendritiques. Il permet alors d'orienter le MET vers une réponse antitumorale [70–73]. Cette chimiothérapie est souvent utilisée dans les protocoles de thérapie cellulaire.

Plusieurs autres stratégies thérapeutiques ont été développées pour modifier le MET en faveur d'un environnement immun antitumoral effectif. Le VEGF a une action protumorale et immunosuppressive en inhibant la maturation des cellules dendritiques, en induisant l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices sur les LT CD8+ et en favorisant l'induction et la maintenance des LT régulateurs [70,72,73]. Des études de combinaison du Bévécizumab avec des ICI ont été menées. Zhu *et al.*

rapportent un taux de réponse globale de 30% (IC 95% : 19-44%) en cas d'association d'ICI avec le Bévacicumab.

Enfin, concernant les PARPi, ceux-ci gênent les mécanismes de réparation de l'ADN et favorisent l'instabilité génomique. Leur efficacité passe par la létalité synthétique, mais passerait également par leur capacité à augmenter la charge mutationnelle tumorale et le nombre de néoantigène même en l'absence d'altération de la voie de recombinaison homologue. Ceci expliquerait l'augmentation, bien que faible, de la SSP dans le groupe Niraparib en comparaison au groupe placebo chez les patientes HRP dans l'étude PRIMA [29]. Par ailleurs, l'activité immunomodulatrice des PARPi passerait par la production d'interféron et de cytokines pro-inflammatoires. La méta-analyse de Zhu *et al.* rapporte un taux de réponse globale de 17 % (IC 95 % : 11-26 %) en cas de combinaison d'un ICI avec un PARPi.

À noter, des résultats de phase I encourageants utilisent des combinaisons de trithérapie par PARPi + anti-VEGF + ICI (Olaparib + Cediranib + Durvalumab) ou CT + ICI + anti-VEGF (Endoxan + Pembrolizumab + Bevacizumab).

Le défi actuel est donc d'agir sur le MET pour le rendre moins immunosuppresseur et orienter les TILs vers une activité cytotoxique antitumorale. Pour ce faire, des études se tournent actuellement sur l'utilisation des cellules du système immunitaire pour orienter le MET vers une activité antitumorale. Nous allons brièvement évoquer ces thérapies cellulaires.

6 Vers les thérapies cellulaires lymphocytaires et au-delà

Les thérapies cellulaires utilisent les TILs ou les lymphocytes périphériques pour induire une réponse antitumorale. De manière synthétique, 3 méthodes peuvent être envisagées et sont illustrées par la Figure 5 [58] :

- La récupération de cellules T naturellement dirigées contre les cellules tumorales du patient soit en récupérant les lymphocytes T dans le sang périphérique par aphérèse soit en récupérant les TILs.
- La modification des lymphocytes T du patient par ingénierie génétique pour faire exprimer un TCR dirigé contre un antigène d'intérêt.
- La modification des lymphocytes T du patient par ingénierie génétique pour faire exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR) dirigé contre un antigène

d'intérêt aussi appelé « CAR T cells ». Actuellement 17 études utilisant des CAR T cells sont référencées sur *ClinicalTrials.gov* comme étant dans les cancers de l'ovaire.

Ces thérapies nécessitent la réalisation de chimiothérapies lympho-déplétives et d'injection d'IL-2 à visée d'expansion lymphocytaire et sont responsables de toxicité non négligeables à type d'infection, de syndrome de relargage cytokinique (SRC) et de neurotoxicité.

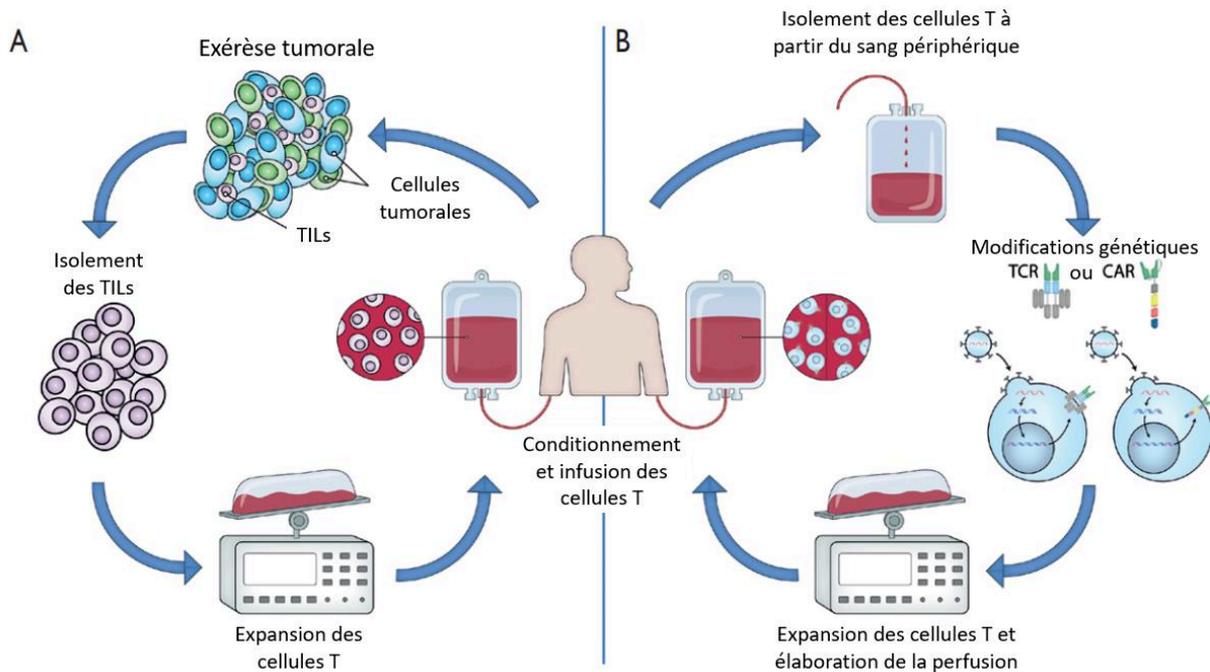


Figure 5. Thérapie cellulaire par transfert adoptif des TILs (A) ou par modification génétique des lymphocytes T sanguins pour qu'ils expriment un TCR ou un CAR spécifique d'un antigène tumoral (B) d'après l'Immuno-Oncology Handbook [58].

Les thérapies cellulaires ont changé les pratiques dans plusieurs hémopathies malignes telles que les lymphomes B diffus à grandes cellules ou les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B. Dans les cancers solides, des résultats intéressants ont également été obtenus dans le mélanome [74]. Les thérapies cellulaires ont été évaluées dans les cancers de l'ovaire depuis le début des années 1990 [75]. Les résultats sont variables et les limites sont marquées par : l'hétérogénéité intratumorale, l'immunogénicité des antigènes de surface, la difficulté d'acheminement des cellules au site tumoral.

D'autres stratégies sont à l'étude, telles que des thérapies cellulaires utilisant les cellules NK. Leur profil de toxicité est différent avec notamment l'absence de SRC et de neurotoxicité du fait d'un profil de sécrétion cytokinique différent, de l'absence de

réaction de greffon VS hôte en l'absence de dépendance des cellules NK au système HLA. La recherche de vaccins antitumoraux utilisant les cellules dendritiques est aussi une voie de recherche active et peut s'associer aux thérapies cellulaires utilisant les lymphocytes T.

La discussion des avantages, limites et perspectives de ces stratégies thérapeutiques peut faire l'objet d'un manuscrit à part entière et n'est pas développée ici.

7 Ascite maligne dans les COSHG

7.1 Physiopathologie

La formation d'ascite maligne est multifactorielle. Elle résulterait d'un déséquilibre entre le drainage lymphatique et la filtration vasculaire. La baisse du drainage se fait par obstruction des vaisseaux lymphatiques par les cellules tumorales. L'augmentation de la filtration vasculaire peut être expliquée par l'augmentation de la perméabilité des néovaisseaux tumoraux via la sécrétion de VEGF, d'IL-6 et d'IL-8 [76,77].

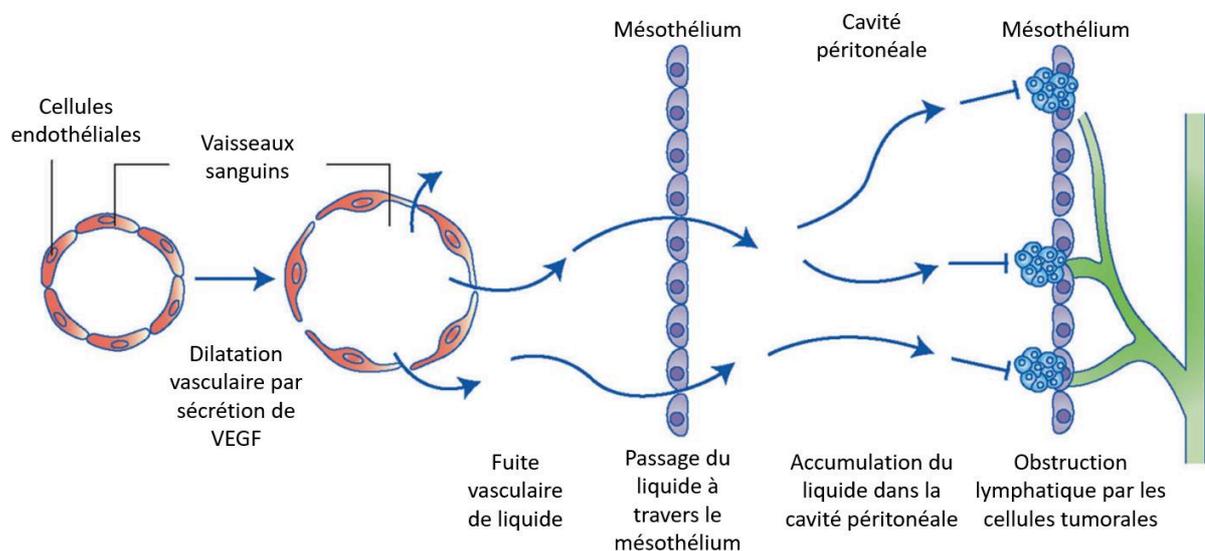


Figure 6. Mécanisme de formation de l'ascite maligne d'après Ford et al. [76]

L'ascite maligne est un liquide riche en cellules diverses : fibroblastes, adipocytes, cellules immunitaires, cellules tumorales isolées ou organisées en sphéroïdes [76]. Les lymphocytes présents dans l'ascite maligne sont appelés « lymphocytes associés aux tumeurs » (TALs). L'ascite contient aussi des composants non cellulaires sécrétés par les cellules composant l'ascite : ADN libre (tumoral et

sain), cytokines, métabolites, exosomes, protéines impliquées dans la communication intercellulaire (Figure 7).

La dissémination péritonéale des cellules tumorales, aussi appelée transcoelomique, passerait par une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales favorisant leur adhésion aux cellules mésothéliales bordant la cavité péritonéale [78]. L'ascite joue un rôle majeur dans cette dissémination de plusieurs manières. La transition épithélio-mésenchymateuse serait induite en partie par l'IL-6 et l'IL-8 présents dans l'ascite et la dissémination transcoelomique serait facilitée par la présence d'ascite. Le sens des flux d'ascite participerait aussi à déterminer la localisation des implants tumoraux péritonéaux [79,80]. Au total, l'ascite est un micro-environnement à part entière où se jouent des interactions, entre composants cellulaires et non cellulaires, qui sont impliquées dans la dissémination péritonéale et la chimiorésistance [77,81].

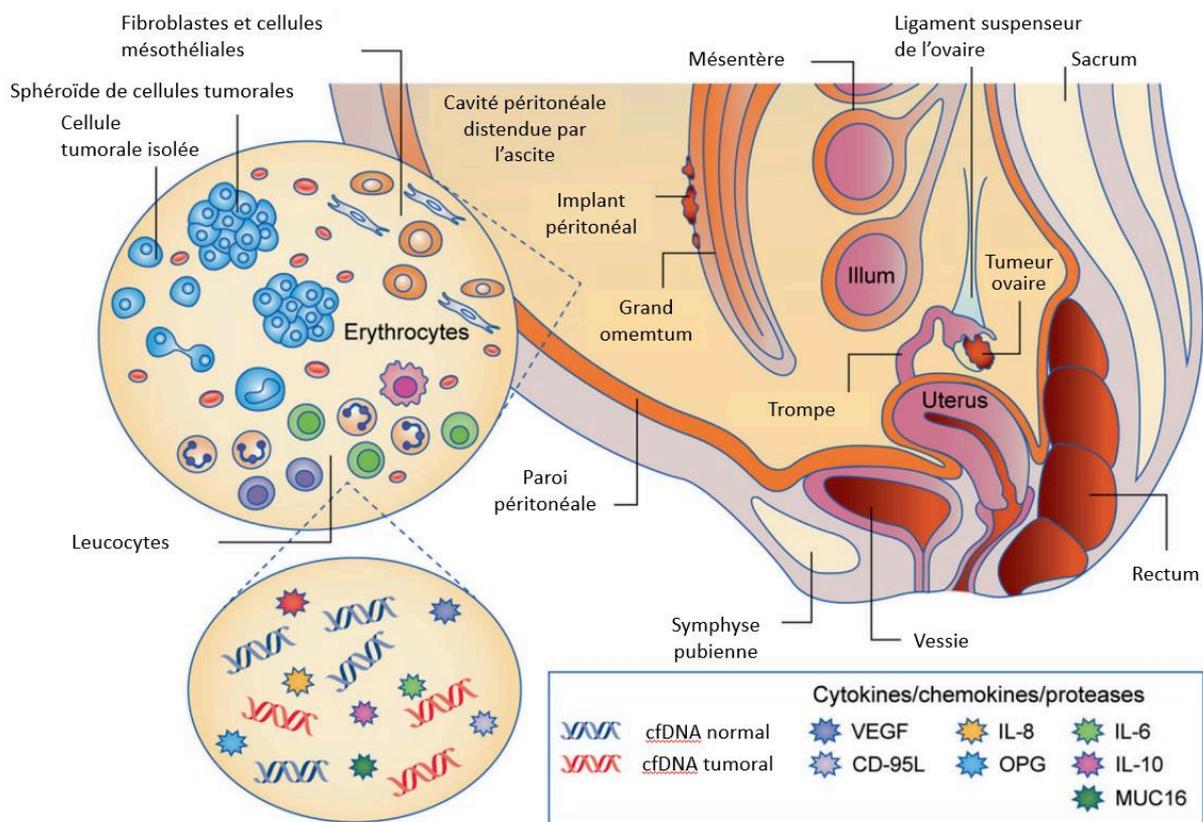


Figure 7. Composition de l'ascite maligne dans le cancer de l'ovaire d'après Ford et al. [76]

Le passage de lymphocytes dans l'ascite est cependant peu décrit. Les TALs pourraient provenir des vaisseaux, mais aussi directement du MET des implants péritonéaux.

7.2 L'ascite : un symptôme fréquent et de mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est la première cause d'ascite maligne chez la femme. Ayantunde *et al.* ont réalisé une étude rétrospective retrouvant une étiologie ovarienne dans 36,7 % des cas d'ascite maligne [82]. Dans cette cohorte, l'ascite était constatée cliniquement dans 41 % des cas. Lorsque cette ascite n'était pas diagnostiquée cliniquement, elle était objectivée lors de la laparotomie ou des examens d'imagerie (scanner ou échographie). Dans cette cohorte, 58 % des patients développaient des symptômes en lien avec l'ascite (augmentation du périmètre abdominal, douleurs, nausée, dyspnée, satiété précoce, asthénie).

La ponction d'ascite permet de soulager les patientes des symptômes causés par la présence d'ascite, mais n'empêche pas la ré-apparition d'ascite. Les diurétiques (spironolactone ou furosémide) sont parfois utilisés lorsqu'il y a une part d'hypertension portale expliquant la production d'ascite. Le traitement par anti-VEGF a montré une augmentation du délai entre 2 ponctions d'ascite [83]. La mise en place d'un drain abdominal est également une option en cas d'ascite récidivante.

Dans une étude sur 333 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire de type épithélial, 80 % des patientes présentent de l'ascite au diagnostic tous stades confondus [84], 90 % chez les patientes avec FIGO III et 100 % en cas de FIGO IV. La présence d'ascite de haut volume (>1.8L) était associée à un pronostic plus sévère. Le seuil définissant une ascite de haut volume est variable entre les études, mais sa valeur pronostique est conservée. À noter que la présence d'ascite est presque systématique lors de la récurrence.

Ainsi, l'ascite est un matériel facilement accessible par une procédure simple, réalisable au lit des patientes. Ce geste permet à la fois de soulager les patientes des symptômes en lien avec l'accumulation de l'ascite et d'avoir accès à du matériel tumoral. Cette procédure est plus simple à mettre en place que les biopsies sous contrôle radiologique ou les biopsies chirurgicales nécessitant une anesthésie

générale. Plusieurs études se sont donc intéressées à l'ascite et à son informativité concernant les cellules tumorales et le MET.

7.3 L'ascite maligne comme biopsie liquide ?

L'ascite est donc un matériel facilement accessible et riche en informations. Patch *et al.* ont pu étudier, en utilisant des prélèvements d'ascite, le génome, le transcriptome et le méthylome des cellules tumorales de patientes en récidive et identifier des mécanismes de résistance à la chimiothérapie [9]. Pour cela, ils ont récupéré les cellules tumorales présentes dans l'ascite grâce à des billes couvertes d'anticorps reconnaissant l'antigène EpCAM présent à la surface des cellules épithéliales. Ils en ont ensuite extrait l'ADN et l'ARN. Ils ont ainsi montré que les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire présentaient une charge mutationnelle (un nombre de SNV) plus élevée lors de la récidive en comparaison au tissu tumoral de ces mêmes patientes avant traitement. Le nombre de SNV semblait lié au nombre de cures de chimiothérapies réalisées. L'apparition d'une résistance à la chimiothérapie pouvait s'expliquer par des mécanismes de réversion des mutations de *BRCA1/2* germinales. Cela pouvait passer par divers mécanismes chez une même patiente et allait jusque 11 mécanismes de réversions différents. De même, les patientes ayant une tumeur initiale comportant une méthylation du promoteur de *BRCA1* pouvaient présenter des clones déméthylés spécifiquement sur le promoteur de *BRCA1* à la récidive. Un autre mécanisme de chimiorésistance, identifié par l'étude des transcrits de fusion, était des fusions impliquant le gène *ABCB1* codant la protéine MDR1. Cette protéine est une pompe à efflux entraînant des résistances au Paclitaxel et à la Doxorubicine.

L'étude des sphéroïdes présents dans l'ascite est aussi riche en informations. Les sphéroïdes sont des agrégats de cellules tumorales non adhérentes, de fibroblastes et de macrophages présents dans l'ascite. Leur formation nécessite une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales via la voie de signalisation Wnt et une perte de l'expression de l'E-cadhérine. Ces sphéroïdes sont chimiorésistants et seraient à l'origine des récidives [76,81]. Kim et al. ont comparé les profils mutationnels de tumeurs primitives à ceux de sphéroïdes [85]. Ils ont ainsi retracé la phylogénie des cellules tumorales et ont montré qu'il existe une séparation précoce entre les clones tumoraux dans la tumeur primitive et dans l'ascite. Les

sphéroïdes présents dans l'ascite présentaient moins d'hétérogénéité que la tumeur primitive et les différents sphéroïdes semblaient provenir d'un clone tumoral unique. L'étude de ces sphéroïdes est intéressante et pourrait permettre l'identification précoce des néoantigènes potentiellement ciblables par thérapie cellulaire des clones tumoraux responsables des récurrences.

7.4 L'infiltration immunitaire dans l'ascite maligne

Le volume de l'ascite lors d'une chirurgie première a été rapporté comme un critère pronostic [84]. Feigenberg *et al.* rapportent des profils d'expression génique différents en fonction du volume de l'ascite. L'ascite de faible volume était enrichie en cellules exprimant des gènes impliqués dans l'immunité [86]. La valeur pronostic de l'ascite pourrait reposer sur son infiltration en cellules immunes. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'un ratio CD4+/CD8+ élevé est associé à un mauvais pronostic [87].

La plupart des articles s'intéressant à l'infiltration de l'ascite maligne utilisent les lymphocytes sanguins comme groupe comparateur. Ces différentes études et leurs résultats principaux sont détaillés dans la Table 1.

La caractérisation des TCR par séquençage permet d'étudier la diversité des clonotypes lymphocytaires entre les patientes et les tissus. Dans l'ascite, le répertoire de clones lymphocytaires semble très variable entre les patientes [88]. L'étude des TCR permet aussi d'identifier les antigènes tumoraux immunogènes. Il serait intéressant de déterminer si l'étude du répertoire de clones lymphocytaires présent dans l'ascite reflète la diversité de clones tumoraux.

Table 1. Résumé des articles s'intéressant aux TALs chez les patientes suivies pour un cancer de l'ovaire

Premier auteur et année	Nombre de patientes	Moment des prélèvements	Technique d'analyse	Lymphocytes étudiés	Comparaison ascite vs	Résultats principaux
Bamias, 2007 [89]	71	Diagnostic (n=49) et récidive (n=22)	CMF	LT CD8+, CD4+, CD4+ REG, cellules NKT	Sang (71) et péritoine (20)	Plus de lymphocytes NKT et LT CD4+ régulateurs dans A vs S.
Giuntoli, 2009 [87]	27	Diagnostic (n=25) et récidive (n=2)	CMF	LT CD4+, LT CD8+	Sang (22)	Faible ratio CD4/CD8 dans A associé à meilleur pronostic. Baisse de l'IL-2 et augmentation de l'IL-6 et l'IL-8 dans A vs S.
Landskron, 2014 [90]	17	Diagnostic	CMF	LT CD4+, LT CD8+, LT CD4+ REG, LT EM, LT naïfs	Sang (17)	Diminution du ratio CD4/CD8 dans A vs S. Proportion augmentée de LT effecteurs/mémoires, LT régulateurs et LT activés dans A vs S.
Lukesova, 2015 [91]	53	Diagnostic	CMF	LT (CD4+ et CD8+) mémoires et naïfs activés ou non, cellules NK et NKT, LB	Sang (53)	Ratio CD4+/CD8+ > 1. Plus de LT activés dans A vs S. Moins de LB et de cellules NK dans A vs S. Présence de LT CD4+ associée à moins bon pronostic et présence de LT CD8+ et cellules NK associée à meilleur pronostic.
Lieber, 2018 [92]	49	Diagnostic	CMF	LT CD8+ et CD4+ et leur sous populations : naïfs, MC, EM et EFF.	Sang (41)	Plus de CD8+ EM et moins de CD8+ EFF et naïfs dans A vs S. Plus de CD4+ EM dans A. Les LT CD8+ EM sont associés à un meilleur pronostic.
Wefers, 2019 [93]	62	Diagnostic	CMF	LT CD4+, CD8+	Pas de comparatif	Ratio de CD4+/CD8+ > 1 dans l'ascite. Tendence à amélioration de la PFS et de l'OS si ratio CD4+/CD8+ faible dans l'ascite (non significatif).
Vazquez, 2020 [94]	15	Diagnostic	CMF	LT CD3+, CD4+ activés, LT naïfs, LT CD4+ et CD8+ EM, LT REG, Th1/Th2/Th17, cellules NK	Pas de comparatif	Proportion de CD4+ proche des CD8+. Les LT CD8+ les plus présents dans l'ascite sont les effecteurs mémoires. Les LT CD4+ les plus représentés étaient les effecteurs mémoires, les Th1, les Th2 et les mémoires centraux.
Tonetti, 2021 [95]	14	Diagnostic	CMF	LT CD8+ et CD4+, CD4+ REG, lymphocytes NK et NKT	Sang (14)	Baisse des CD4+ et augmentation des CD8+ dans A vs S, ratio CD4/CD8 > 1. Tendence à augmentation des CD4+ régulateurs dans A. Augmentation de l'expression lymphocytaire de PD1 dans A vs S.

A : ascite ; CMF : cytométrie en flux ; EFF : effecteur ; EM : effecteurs/mémoires ; LB : lymphocytes B ; LT : lymphocytes T ; MC : mémoires centraux ; REG : régulateurs ; S : sang

Objectif de l'étude

Ce travail peut être dissocié en deux parties. La première partie a pour but de faire la synthèse des écrits récents sur l'étude des TILs dans les cancers de l'ovaire. La deuxième partie a pour but de comparer les caractéristiques phénotypiques des lymphocytes présents dans l'ascite et dans la carcinose péritonéale de patientes suivies pour un cancer de l'ovaire avancé. Pour cela, nous avons utilisé les données recueillies dans l'étude TILSOV-1805, une étude visant à caractériser l'infiltrat lymphocytaire au diagnostic et après chimiothérapie dans les cancers ovariens de stade avancé dans le sang, l'ascite et le péritoine.

Matériel et méthodes

1 Méthodologie de réalisation de la revue de la littérature

Les critères PRISMA-P 2015 [96] visent à structurer la méthodologie pour la réalisation de revues systématiques et de méta-analyses. Nous avons réalisé nos recherches d'articles dans les bases de données EMBASE via Embase et MEDLINE via Ovid suivant des mots clés prédéfinis identiques pour ces 2 bases. Ces mots clés concernaient : le micro-environnement tumoral, les lymphocytes T infiltrant la tumeur, les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes B, les lymphocytes T helper, les lymphocytes T régulateurs, les immunocheckpoints, les lymphocytes folliculaires auxiliaires et des mots clés concernant les cancers de l'ovaire et ses sous-types.

Nous avons ensuite éliminé les doublons obtenus par les recherches dans les 2 bases de données puis nous avons éliminé les articles correspondant à des revues, lettres, commentaires, éditos. En nous basant sur les résumés d'articles, nous avons éliminé les articles n'abordant pas les TILs et les cancers de l'ovaire avancés, les études pré-cliniques ou in vitro, les essais thérapeutiques, les revues/éditos qui n'auraient pas été vus à l'étape précédente, les études de cas. Après lecture des articles sélectionnés, nous avons éliminé les articles traitant de paramètres immuns autres que les TILs, les études sur plasma, les études sur animaux ou in vitro non éliminés lors de l'étape précédente, les articles traitant de multiples cancers et de façon minoritaire des cancers de l'ovaire.

Par la suite, nous avons séparé la revue en différentes sous parties : la définition des TILs, les différentes sous-populations de TILs, la valeur pronostique des TILs, l'influence des altérations des voies de réparation de l'ADN sur les TILs, les TILs et immunocheckpoint, l'influence de la chimiothérapie sur les TILs.

Je me suis chargée de la sélection d'articles parus en 2021 et de la rédaction des parties suivantes : "Influence of DNA repair deficiency on TILs", "Influence of first line chemotherapy on TILs landscape", "Perspectives" et participation à l'écriture du reste de la review.

2 Méthodologie du projet exploratoire de TILSOV-1805

2.1 Conception de l'étude

L'étude TILSOV-1805 est une étude prospective, unicentrique, interventionnelle, non randomisée réalisée au Centre Oscar Lambret à Lille. Elle est déclarée sur le site clinicaltrials.gov (NCT 03922776). Cette étude s'adresse aux patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ou des trompes à un stade avancé. Il est réalisé plusieurs prélèvements de sang, ascite et péritoine à différents moments de leur histoire : avant ou après chimiothérapie. Le but de l'étude est de décrire le profil immunologique à ces différents moments au niveau du sang (cellules mononucléées sanguines périphériques), du péritoine (TILs) et de l'ascite (TALs). Ma thèse est un projet exploratoire ancillaire de l'étude TILSOV.

Les critères d'inclusion de l'étude TILSOV-1805 étaient :

- Patiente âgée de 18 ans ou plus ;
- Présence d'une carcinose avec suspicion de cancer de l'ovaire ou cancer tubaire, stade IIIC ou IV pleural initial, relevant d'une coelioscopie diagnostique ;
- Traitement planifié par chirurgie et chimiothérapie adjuvante, ou chimiothérapie néo-adjuvante puis chirurgie +/- chimiothérapie adjuvante ;
- Patiente informée et ayant signé le consentement éclairé de la présente étude ;
- Affiliée à un régime de sécurité sociale.

Les critères d'exclusion étaient :

- Stade IV avec métastases viscérales (pulmonaires, hépatiques...) ;
- Contre-indication à la chirurgie et/ou à la chimiothérapie ;
- Femme enceinte ou allaitante ;
- Patiente sous tutelle ou curatelle.

2.2 Recueil et traitements des échantillons

Les prélèvements ont été réalisés lors de la coelioscopie diagnostique. Étaient recueillis à visée de recherche : 5 mL d'ascite (ou de lavage péritonéal en l'absence d'ascite), un fragment péritonéal d'environ 2 cm². Les échantillons de péritoine étaient découpés au scalpel en fragments de 2 à 4 mm afin de dissocier les cellules à l'aide

du gentleMAC® (Miltenyi), dissociateur mécanique. L'ascite, elle, était filtrée et les globules rouges étaient lysés en cas d'ascite sanglante. Les échantillons mis en suspension étaient ensuite incubés avec les différents anticorps de marquage membranaires ou cytoplasmique (Table 2). Cet immuno-phénotypage permettant de définir des sous-populations cellulaires.

Table 2. Anticorps de marquage des lymphocytes

Antigène cible	fluorochrome	clone	fournisseur
CD4	BUV395	<i>RPA-T4</i>	BDBioscience
Tim-3 CD 366	BV 421	<i>7D3</i>	BDBioscience
CD3	BV510	<i>SK7</i>	BioLegend
CCR6	SB 600	<i>R6H1</i>	eBioscience
CD56 - NCAM	BV 711	<i>5.1H11</i>	BioLegend
PD-1 - CD 279	FITC	<i>MIH4</i>	eBioscience
Crth2 - CD294	PE	<i>BM16</i>	BioLegend
CD45RA	PE Cyan7	<i>HI100</i>	eBioscience
CD25	APC	<i>4.E.3</i>	Miltenyi
CD27	SB 780	<i>O323</i>	eBioscience
PDL-1 - CD 274	PE	<i>MIH1</i>	eBioscience
CD8	PE Cyan5	<i>RPA-T8</i>	eBioscience
CTLA4 - CD152	APC	<i>REA1003</i>	Miltenyi
CXCR5	SB 436	<i>MU5UBEE</i>	eBioscience
ICOS	BV 785	<i>C398.4A</i>	BioLegend
CXCR3 -CD183	PE	<i>REA232</i>	Miltenyi
Bcl6	APC	<i>REA373</i>	Miltenyi
IgD	BV 421	<i>IA6-2</i>	BioLegend
CD38	PerCPCyan5,5	<i>HIT2</i>	BDBioscience
CD19	FITC	<i>LT19</i>	Miltenyi
CD10	PE	<i>97C5</i>	Miltenyi
CD20	PE Cyan7	<i>2H7</i>	eBioscience
IgM	APC	<i>SA-DA4</i>	eBioscience
Zombie Red™ Fixable	Viability Kit		BioLegend

2.3 Analyse des échantillons

Les échantillons marqués ont ensuite été analysés par cytométrie en flux. La cytométrie en flux permet à la fois un décompte et la caractérisation phénotypique des lymphocytes. Après marquage, les cellules passent dans un capillaire permettant de

les individualiser. L'équipement par laser permet de caractériser la taille cellulaire (FSC), la complexité cellulaire (SSC) ainsi que les lumières émises par les fluorochromes marquant les cellules. Les longueurs d'onde spécifique aux différents fluorochromes sont recueillies par un photomultiplicateur dédié (Figure 8). Des représentations graphiques sont ainsi générées et il est possible de dessiner des fenêtres informatiques permettant d'identifier des sous-populations cellulaires. L'avantage de la CMF en comparaison à l'IHC est la grande rapidité de réalisation de la technique, la possibilité d'utiliser de nombreux marqueurs sur un seul échantillon et sa capacité de quantification quand l'IHC est semi-quantitative. La même machine de CMF a été utilisée pour l'ensemble des échantillons et l'analyse a été réalisée par la même personne.

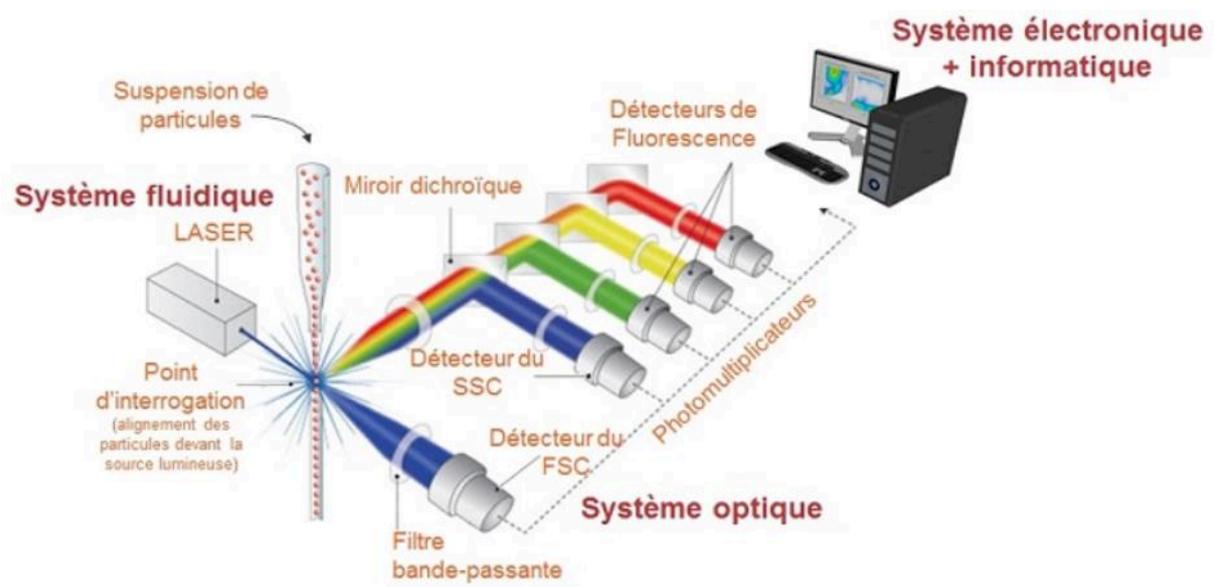


Figure 8. Principe de la cytométrie en flux (tiré de : https://www.univ-reims.fr/minisite_87/plateau-technique-de-cytometrie-en-flux/urcacyt-plateau-technique-de-cytometrie-en-flux,17140,31442.html).
SSC : Side Scatter, analyse de la réfraction de la lumière permettant d'étudier la granularité des cellules ;
FSC : Forward Scatter, diffusion de la lumière dans l'axe permettant d'étudier la taille des cellules.

Le cytomètre en flux utilisé était le modèle LSR Fortessa BDBioscience, 5 lasers, de la plateforme d'imagerie cellulaire BICeL de Lille. Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo v10 10.8.0 (FlowJo™). Cette méthode a permis d'analyser ces sous-populations lymphocytaires : lymphocyte T, lymphocyte CD8+, lymphocyte CD4+, lymphocyte régulateur, lymphocyte CD4+ mémoire, lymphocyte CD8+ mémoire, lymphocyte T auxiliaire, lymphocyte TH1, lymphocyte TH2, lymphocyte TH17, lymphocyte folliculaire T auxiliaire, lymphocyte NK, lymphocyte B et plasmocytes, les lymphocytes CD3, CD8+ et CD4+ exprimant PD1 et CTLA4.

Avant l'inclusion de la première patiente, des compensations de fluorescence ont été réalisées avec des tubes par monomarquage pour calibrer l'appareil de mesure aux anticorps utilisés. Le même calibrage a été utilisé pour l'ensemble des patientes.

2.4 Analyse de données

Ce travail vise à comparer la proportion de chaque sous-population lymphocytaire dans l'ascite et dans le péritoine puis à évaluer si la différence entre ces proportions est significative.

Les CD3+ sont exprimés en pourcentage par rapport à l'ensemble des lymphocytes ; les CD8+, les CD4+ et les cellules NK en pourcentage par rapport aux lymphocytes ; les CD8 mémoires en pourcentage par rapport au CD8 ; les CD4 mémoires, par rapport aux CD4 ; les TH1, TH2, TH17 et TFH en pourcentage des CD4 mémoires ; les TFH naïfs, TFH1, TFH2 et TFH17 en pourcentage par rapport à l'ensemble des TFH, les lymphocytes B en pourcentage par rapport à l'ensemble des lymphocytes ; les LB naïfs, mémoires ou les plasmocytes en pourcentage par rapport à l'ensemble des lymphocytes B.

La stratégie d'analyse des lymphocytes T peut être trouvée à la Figure 9, la stratégie d'analyse des lymphocytes B à la Figure 10, la stratégie d'analyse des points de contrôle immunitaires à la Figure 11. Le fenêtrage de chaque sous-population est le même entre toutes les patientes, mais diffère d'un type de prélèvement à un autre.

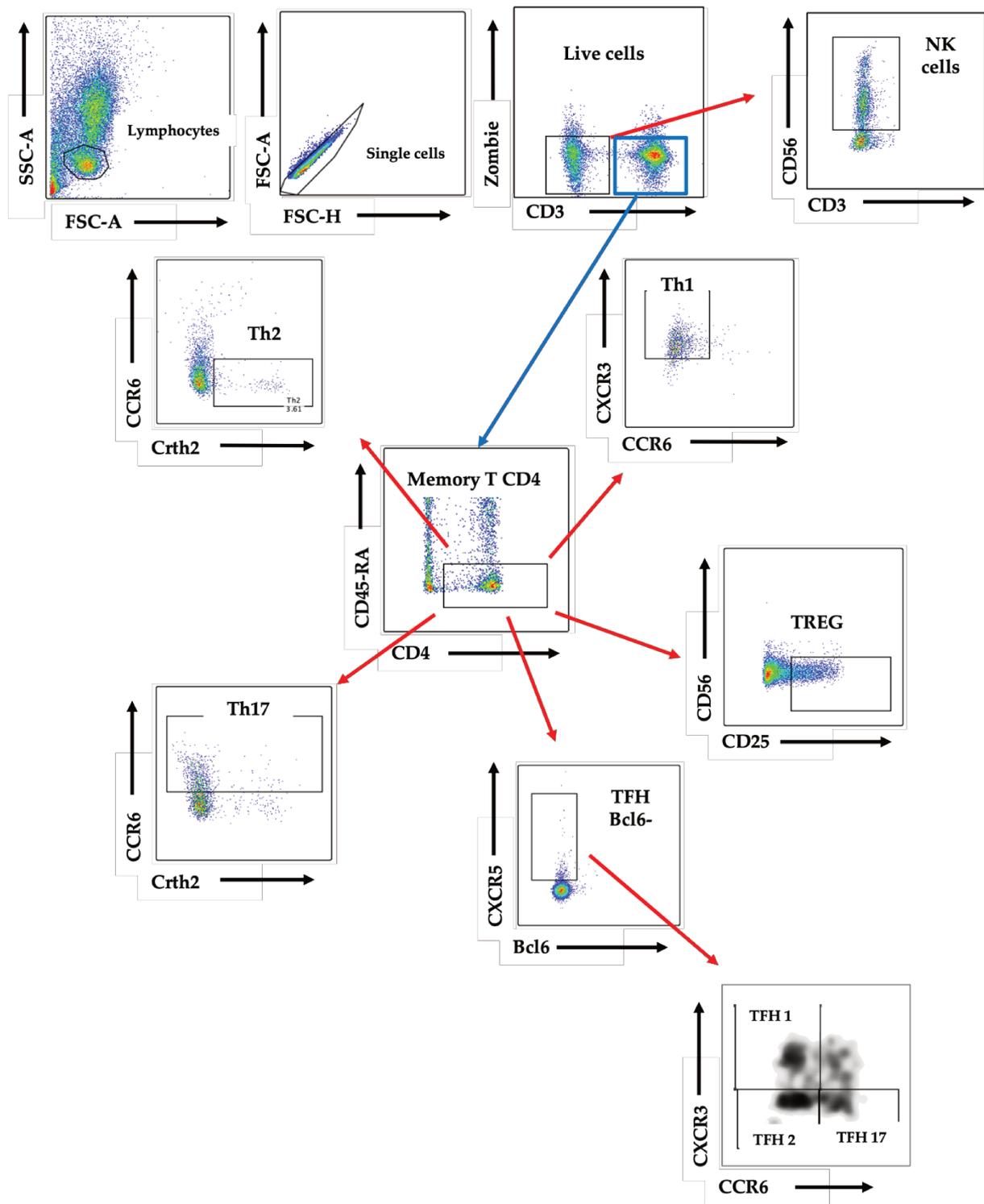


Figure 9. Stratégie d'analyse des lymphocytes T

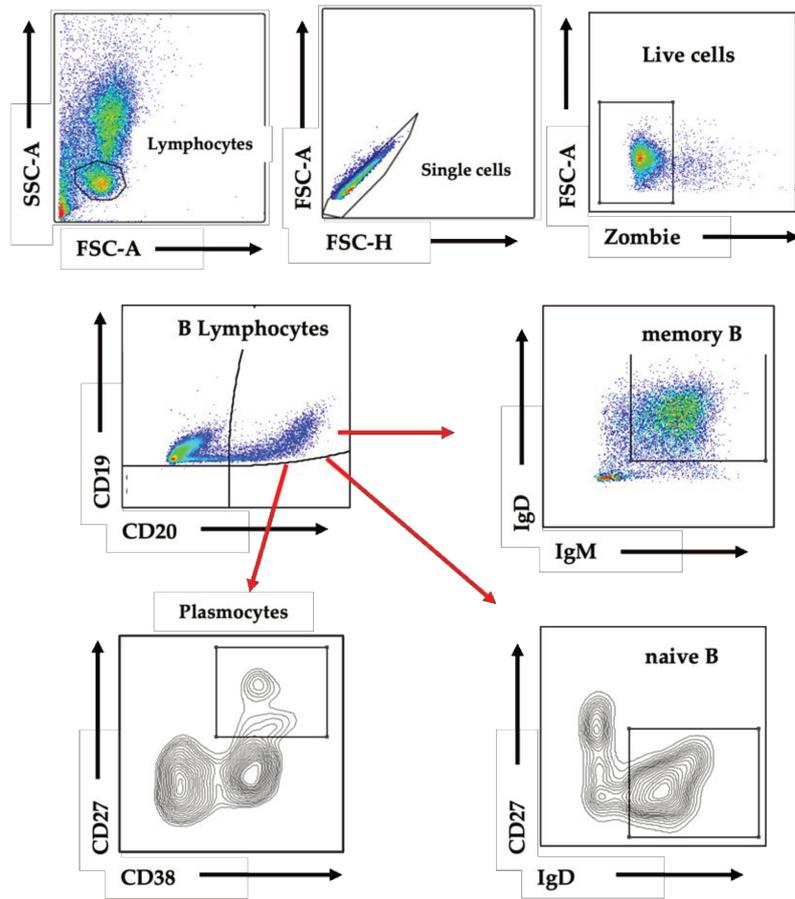


Figure 10. Stratégie d'analyse des lymphocytes B

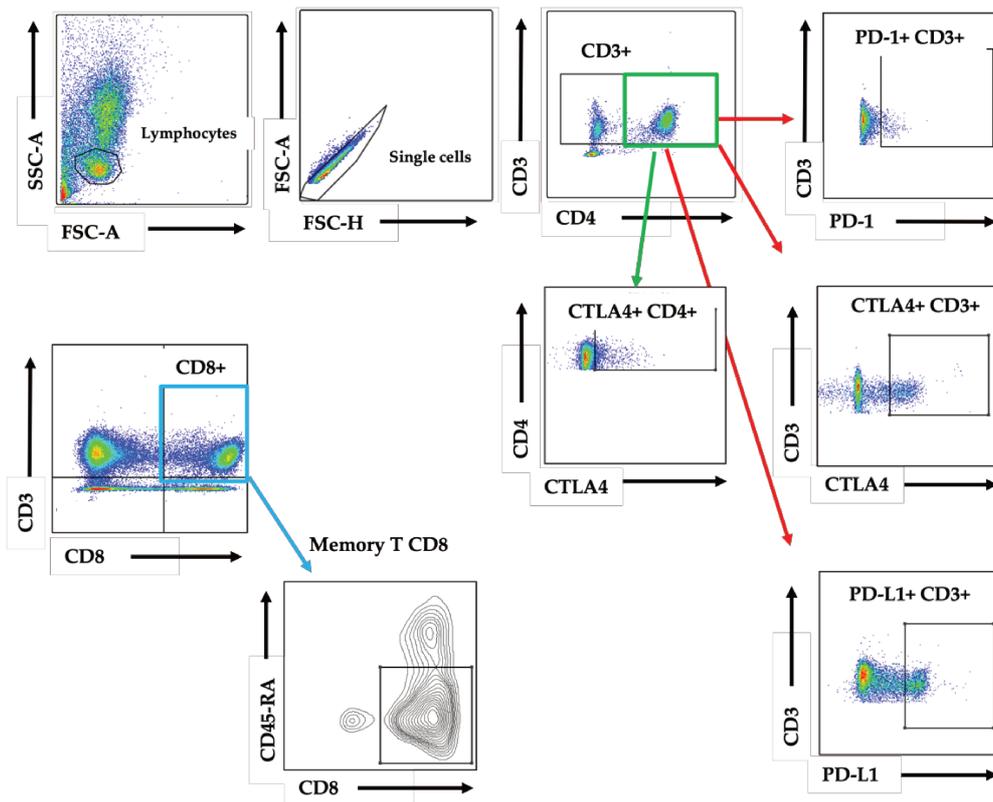


Figure 11. Stratégie d'analyse des points de contrôle immunitaires

2.5 Analyses statistiques

Le logiciel utilisé pour les analyses statistiques est le Stata Software v15.0 (StataCorp 2017. *Stata Statistical Software:Release 15*. College Station, TX: StataCorp LLC). Les caractéristiques de la population sont décrites en nombre absolu, pourcentage, médiane, valeurs extrêmes, moyenne et écart-type. Les différentes populations de TILs et de TALs sont décrites par des médianes, valeurs extrêmes, moyennes et écarts-types.

Le test de Shapiro Wilk a été utilisé pour tester la distribution normale des variables dans les échantillons. Devant une distribution non gaussienne, le test de Wilcoxon a été utilisé pour tester la différence de distribution des TILs et des TALs. Le test de Wilcoxon est un test non paramétrique permettant de comparer des groupes appariés de petite taille ($N < 30$). Tous les tests ont été réalisés avec un seuil alpha de 5 %, mais devant la multiplicité des tests et donc du risque élevé de résultats significatifs dus au hasard, les analyses ont été considérées comme exploratoires et les résultats significatifs devront être confirmés sur échantillons indépendants étudiant spécifiquement ces associations. La moyenne des différences de valeurs entre l'ascite

et le péritoine pour chaque patient a été analysée, le test permettait d'analyser si elle était significativement différente de zéro.

L'étude TILSOV a été construite initialement pour analyser 50 patientes avec des prélèvements initiaux et donc inclure 55 patientes (en considérant un taux de patients non évaluables de 10 %).

La représentation graphique des boîtes à moustache représente du haut vers le bas :

- La valeur adjacente supérieure : la valeur la plus proche égale ou inférieure au 75^e percentile + 1,5*l'écart interquartile ;
- La charnière supérieure : le 75^e percentile ;
- La ligne dans la boîte : la médiane ;
- La charnière inférieure : le 25^e percentile ;
- La valeur adjacente inférieure : la valeur la plus proche égale ou supérieure au 25^e percentile -1.5*l'écart interquartile.

Les valeurs extrêmes (outliers, supérieures au 75^e percentile + 1,5*l'écart interquartile ou inférieures au 25^e percentile -1.5*l'écart interquartile) sont indiquées en note des graphiques par une étoile. La dispersion des points est représentée autour de l'axe central avec un faible bruit aléatoire afin de pouvoir mieux visualiser les points se chevauchant.

2.6 Cadre réglementaire

Cette étude rentre dans le groupe de Recherche Impliquant la Personne Humaine catégorie 2 ne portant pas sur un produit (articles L.1121-1 et L.5311-1 du code de la santé publique). C'est une recherche interventionnelle qui ne comporte que des risques minimes et des contraintes minimes (prélèvements biologiques). Un avis favorable du CPP XI a été obtenu le 18/09/2018 puis des avis favorables ont été rendus suite aux amendements n°1 (du 31/12/2018, AF le 22/05/2019) et n°2 (du 15/04/2021, AF le 16/09/2021). L'information à l'ANSM a été réalisée le 20/09/2018. Le promoteur de l'étude est le Centre Oscar Lambret et s'est engagé à se conformer à la MR001 de la CNIL. Les patientes sont informées et signent un consentement écrit libre et éclairé pour participer à cette étude. Une assurance a été prise dans le cadre de cette étude. Elle est enregistrée sous un numéro IDRCB conformément à la loi.

Résultats

1 Partie revue de la littérature

La revue de la littérature se trouve en Annexe 2. Elle est en cours de révision dans la revue Cancers.

2 Partie projet ancillaire exploratoire TILSOV

Ce projet exploratoire sera présenté sous forme de poster au Congrès de l'Association Européenne de Recherche en Cancérologie à Séville le 22 juin 2022.

2.1 Caractéristiques des patientes

Au 12/03/2022, 21 patientes ont été incluses dans l'étude (Figure 12). Les caractéristiques histologiques et moléculaires des patientes incluses sont présentées dans la Sur le plan moléculaire, 7 des 21 patientes présentaient une mutation *BRCA* positive (5 *BRCA1* et 2 *BRCA2*). Le phénotype RER a été recherché chez 6 patientes, toutes présentaient un phénotype microsatellitaire stable. Une patiente a reçu une analyse *via* le test Myriad® qui a retrouvé un variant de signification inconnue de *BRCA1*.

Table 3 et les caractéristiques cliniques dans la Table 4. L'âge médian des patientes était de 69.4 ans. L'histologie principale était le COSHG, dans 95 % des cas. Une patiente avait un carcinome hépatoïde ovarien. Les patientes présentaient un stade FIGO IIIC dans 95 % des cas, un stade IV pleural au diagnostic dans 5% des cas. Le PCI médian au diagnostic était de 20. L'ascite au diagnostic était présente chez 76 % des patientes, sans que cela soit pour autant constaté cliniquement. Ainsi, seules 14 % des patientes présentaient une augmentation du volume abdominal au diagnostic. Dans notre étude, 48 % des patientes présentaient des douleurs au diagnostic, 62 % présentaient des symptômes : ballonnement, constipation, métrorragies, sub-occlusion, perte d'appétit ou de poids.

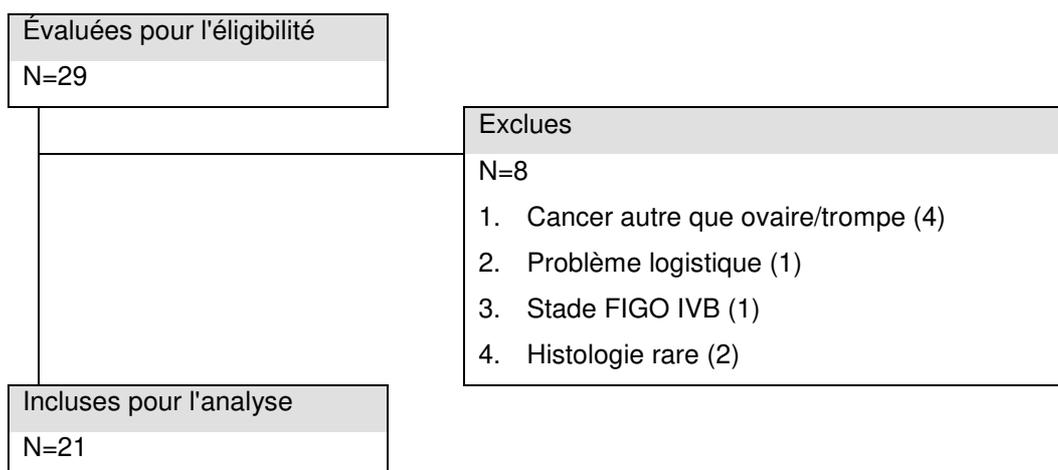


Figure 12. Diagramme de flux de l'étude TILSOV-1805

Sur le plan moléculaire, 7 des 21 patientes présentaient une mutation *BRCA* positive (5 *BRCA1* et 2 *BRCA2*). Le phénotype RER a été recherché chez 6 patientes, toutes présentaient un phénotype microsatellitaire stable. Une patiente a reçu une analyse *via* le test Myriad® qui a retrouvé un variant de signification inconnue de *BRCA1*.

Table 3. Caractéristiques histologiques et moléculaires des patientes incluses

Caractéristiques histologiques et moléculaires N(%)	TOTAL N=21
Type histologique	
COSHG	20 (95%)
Autre (Héptoïde ovarienne)	1 (5%)
BRCA tumeur	NR=3
Négatif	13 (72%)
Positif BRCA1	4 (22%)
Positif BRCA2	1 (6%)
BRCA sang	NR=10
Négatif	6 (55%)
Positif	5 (46%)
BRCA sang : type	NR=15
BRCA1	4 (67%)
BRCA2	1 (17%)
BRCA2 variant de signification inconnue	1 (17%)
Statut HRD	NR=20
BRCA1 variant de signification inconnu	1 (100%)
Phénotype RER	NR=15
MSS	6 (100%)

Une chirurgie première a été réalisée chez 5 patientes (24 %) et une CTNA a été délivrée chez 16 patientes (76 %). Parmi ces patientes ayant reçu de la CTNA, 6 patientes ne seront pas opérées. Au total, 15 patientes ont été opérées (d'emblée ou secondairement). Le nombre de cures de chimiothérapie médian avant chirurgie était de 6. L'ensemble des patientes opérées ont reçu une chimiothérapie adjuvante avec une médiane de 3 cures adjuvantes.

Table 4. Caractéristiques cliniques des patientes incluses

Caractéristiques cliniques N(%) – Med[extrêmes]	TOTAL N=21
Âge	
Médiane en années (Min ;Max)	69.4 [43.3;85.9]
ATCD fam. cancer sein < 50 ans	
Oui	12 (57%)
Ascite initial	
Oui	16 (76%)
Augmentation du volume abdominal	
Non	18 (86%)
Douleur	
Oui	10 (48%)
Altération de l'état général	
Non	21 (100%)
Autre symptôme clinique	
Non	8 (38%)
Oui	
(Anémie microcytaire, ascite et masse pelvienne, ballonnements abdominaux, constipation, hernie ombilicale, métrorragies noirâtres sur masse utérine, perte d'appétit, perte de poids, sub-occlusion)	13 (62%)
Stade FIGO	
IIIC	20 (95%)
IV pleural	1 (5%)
Score de Sugarbaker initial	NR=1
Médiane (Min ;Max)	20 [11;39]
Décision thérapeutique (initiale)	
Chirurgie première	5 (24%)
Chimiothérapie néo-adjuvante	16 (76%)
Chirurgie	
Non	6 (29%)
Oui	15 (71%)
SI CHIRURGIE	N=15
Moment de la chirurgie	
Chirurgie initiale	5 (33%)
Chirurgie intervalaire	10 (67%)
SI CHIRURGIE INTERVALAIRE	N=10
Nombre cures avant chirurgie	
Médiane-(Min ;Max)	6 [3;9]
SI CHIRURGIE	N=15
CT adj	
Oui	15 (100%)

2.2 Proportions des différentes populations lymphocytaires dans l'ascite en comparaison au péritoine au diagnostic

La proportion de chaque sous-population lymphocytaire est représentée dans la Table 5 et sous forme graphique dans la Figure 13. Avant introduction d'un traitement par chimiothérapie, la proportion de lymphocytes CD3+ dans l'ascite est plus importante que dans le péritoine (58.3 % vs 23.6%, $p=0.01$). Parmi les lymphocytes T, la proportion de CD4+ est plus importante dans l'ascite (19.2 % vs 3.6 %, $p=0.002$). Il n'y a pas de différence lorsque l'on regarde la proportion de CD8+ total, mais il semble y avoir une proportion plus importante de CD8 mémoires dans le péritoine que dans l'ascite, 29.4 % vs 20.2 % ($p=0.044$). Le ratio CD4+/CD8+ est significativement plus important dans l'ascite (0.7 vs 0.3, $p=0.002$). Parmi la sous-population de CD4+, les CD4 mémoires sont moins présents dans l'ascite que dans le péritoine (82.4 % vs 99.1 %, $p=0.002$) avec un enrichissement de CD4 régulateurs dans l'ascite en comparaison au péritoine (7.9 % vs 1.8 %, $p=0.003$). Les différentes sous-populations de lymphocytes T auxiliaires, Th1, Th2 et Th17 ne semblent pas être différentes dans l'ascite en comparaison au péritoine, tout comme les lymphocytes T folliculaires auxiliaires. La proportion de cellules NK est significativement augmentée dans le péritoine avec 18.9 % vs 6.9 % dans l'ascite ($p=0.002$). Concernant la population de LB, il ne semble pas y avoir de différence dans la proportion de LB ou de plasmocytes dans l'ascite en comparaison au péritoine. La proportion de LB naïfs est augmentée dans l'ascite en comparaison au péritoine (64 % vs 52.3 %, $p=0.03$). Il n'y a cependant pas de différence lorsque l'on considère les LB mémoires. Les lymphocytes T CD4 exprimant le PD1 sont moins importants dans l'ascite que dans le péritoine, 5.3 % vs 14.6 % ($p=0.001$), de même pour les LT CD8+, 2.9 % vs 19.7 % ($p<0.001$). Il n'y a pas de différence observée lorsque l'on s'intéresse au CTLA4.

Table 5. Proportion des différentes populations lymphocytaires au diagnostic

Paramètres avant la CT	Péritoine N=21	Ascite N=21	Ascite-Péritoine N=21	p ⁽¹⁾	z
CD3+ (%)				0.01	2.54
Médiane-(Min,Max)	23.6 [1.1;82.7]	58.3 [0.1;86.2]	14.6 [-60.8;67.4]		
CD4+ (%)				0.002	3.05
Médiane-(Min,Max)	3.6 [0;32.3]	19.2 [0;72.5]	8.5 [-12;55.4]		
CD8+ (%)	NR=2	NR=2	NR=2	0.31	1.01
Médiane-(Min,Max)	14.2 [2.6;50.4]	22.1 [0.1;42.5]	4.8 [-49.8;33.9]		
Ratio CD4+/CD8+	NR=2	NR=2	NR=2	0.002	3.08
Médiane-(Min,Max)	0.3 [0;1.7]	0.7 [0;4.4]	0.4 [-0.6;3.6]		
CD8 MEM (%)	NR=2	NR=2	NR=2	0.044	-2.01
Médiane-(Min,Max)	29.4 [5.7;97.1]	20.2 [3.2;68.5]	-10.8 [-71.1;25]		
CD4 MEM (%)				0.002	-3.16
Médiane-(Min,Max)	99.1 [0;100]	82.4 [0;95.8]	-9.7 [-50;35.8]		
NK (%)	NR=1		NR=1	0.002	-3.02
Médiane-(Min,Max)	18.9 [1.3;73.8]	6.3 [0.9;35.4]	-9.4 [-63.3;24.7]		
TH1 (%)				0.55	0.59
Médiane-(Min,Max)	42.9 [0;93.4]	50.6 [0;91.2]	0.7 [-56.5;61.6]		
TH2 (%)	NR=1		NR=1	0.91	0.11
Médiane-(Min,Max)	1.6 [0;10]	1.4 [0;7.9]	0 [-10;6.8]		
TREG (%)	NR=1		NR=1	0.003	2.97
Médiane-(Min,Max)	1.8 [0;10]	7.9 [0;23.4]	4.3 [-10;20]		
TH17 (%)	NR=1		NR=1	0.08	1.77
Médiane-(Min,Max)	4.2 [0;66.7]	10.9 [0;40]	1.3 [-26.7;23.3]		
TFH (%)				0.97	-0.03
Médiane-(Min,Max)	2.1 [0;94.4]	2.5 [0;69]	0.1 [-43.4;25.3]		
TFH1 (%)				0.90	-0.12
Médiane-(Min,Max)	29.5 [0;100]	19.4 [0;100]	0 [-80.6;59.9]		
Moyenne-écart-type	33.9 (34.3)	31.3 (32.1)	-2.6 (37.7)		
TFH2 (%)				0.58	-0.56
Médiane-(Min,Max)	7.7 [0;90.9]	14.3 [0;68.3]	-0.7 [-76.5;36.1]		
TFH17 (%)				0.79	0.26
Médiane-(Min,Max)	7.3 [0;75.1]	4.9 [0;60]	0 [-45.1;47.9]		
LB (%)	NR=1		NR=1	0.74	-0.34
Médiane-(Min,Max)	3.3 [0.7;22]	3 [0;18.2]	0.4 [-15.7;9.8]		
LB naïf (%)	NR=1	NR=1	NR=2	0.03	2.17
Médiane-(Min,Max)	52.3 [21.8;98.6]	64 [26.7;85.7]	10.6 [-28.1;47.8]		
LB MEM (%)	NR=1	NR=1	NR=2	0.31	1.01
Médiane-(Min,Max)	54.9 [30.2;99.2]	64 [0.9;86.1]	3.4 [-61.9;41.2]		
Plasmocyte (%)	NR=1	NR=1	NR=2	0.28	-1.09
Médiane-(Min,Max)	5.1 [0.1;20]	2.6 [0;17.2]	-0.7 [-19.1;16]		
PD1+ total (%)				0.11	1.62
Médiane-(Min,Max)	4.2 [0.2;71.9]	19.9 [0;47.9]	12.8 [-60.5;39.3]		
PD1+ CD4+ (%)				0.001	-3.19
Médiane-(Min,Max)	14.6 [0;57.1]	5.3 [0;50]	-7.3 [-43.9;50]		
PD1+ CD8+ (%)	NR=2	NR=2	NR=2	<0.001	-3.82
Médiane-(Min,Max)	19.7 [4.7;97.5]	2.9 [0.2;42.6]	-14.8 [-90.3;-2.5]		
PD1+ CD3+ (%)				<0.001	-4.01
Médiane-(Min,Max)	8.6 [2.1;86.8]	1.1 [0;20.1]	-6.1 [-80.6;-0.9]		
CTLA4+ total (%)	NR=2	NR=2	NR=2	0.75	-0.32
Médiane-(Min,Max)	0 [0;0.2]	0 [0;5.2]	0 [-0.2;5]		
CTLA4+ CD4+ (%)	NR=2	NR=2	NR=2	0.40	-0.85
Médiane-(Min,Max)	0.7 [0;42.9]	0.3 [0;11.8]	0 [-38.8;6.2]		
CTLA4+ CD8+ (%)	NR=2	NR=2	NR=2	0.29	-1.07
Médiane-(Min,Max)	0.9 [0.1;79]	0.1 [0;63.3]	-0.1 [-72.2;41.6]		
CTLA4+ CD3+ (%)	NR=2	NR=2	NR=2	0.84	-0.2
Médiane-(Min,Max)	0.1 [0;45.2]	0 [0;17.7]	0 [-44.2;16.5]		

(1) p-value du test de Wilcoxon pour données appariées, testant la différence de distribution. Un z positif est lié à une distribution des valeurs plus grandes dans l'ascite.

Au total, avant chimiothérapie, le micro-environnement immun dans l'ascite semble enrichi en lymphocyte T ayant des propriétés régulatrices et pauvre en cellules cytotoxiques aidant possiblement à la propagation tumorale au sein du péritoine par dissémination dans le liquide d'ascite. Par ailleurs, les lymphocytes mémoires sont moins nombreux dans l'ascite, les lymphocytes T ainsi sécrétés dans l'ascite seraient naïfs, prêts à être recrutés dans les sites métastatiques péritonéaux.

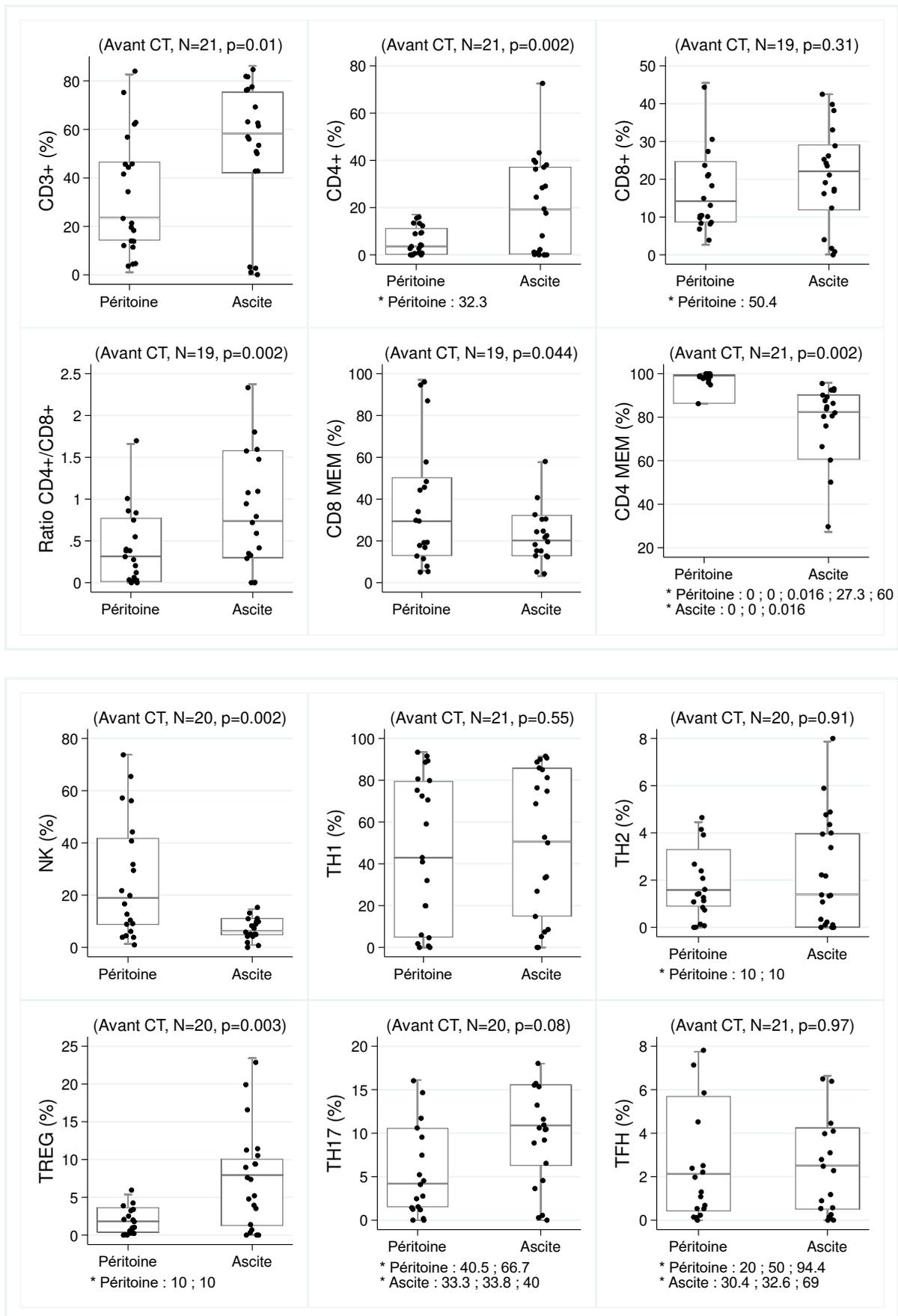


Figure 13. Représentation graphique des populations lymphocytaires dans le péritoine et dans l'ascite

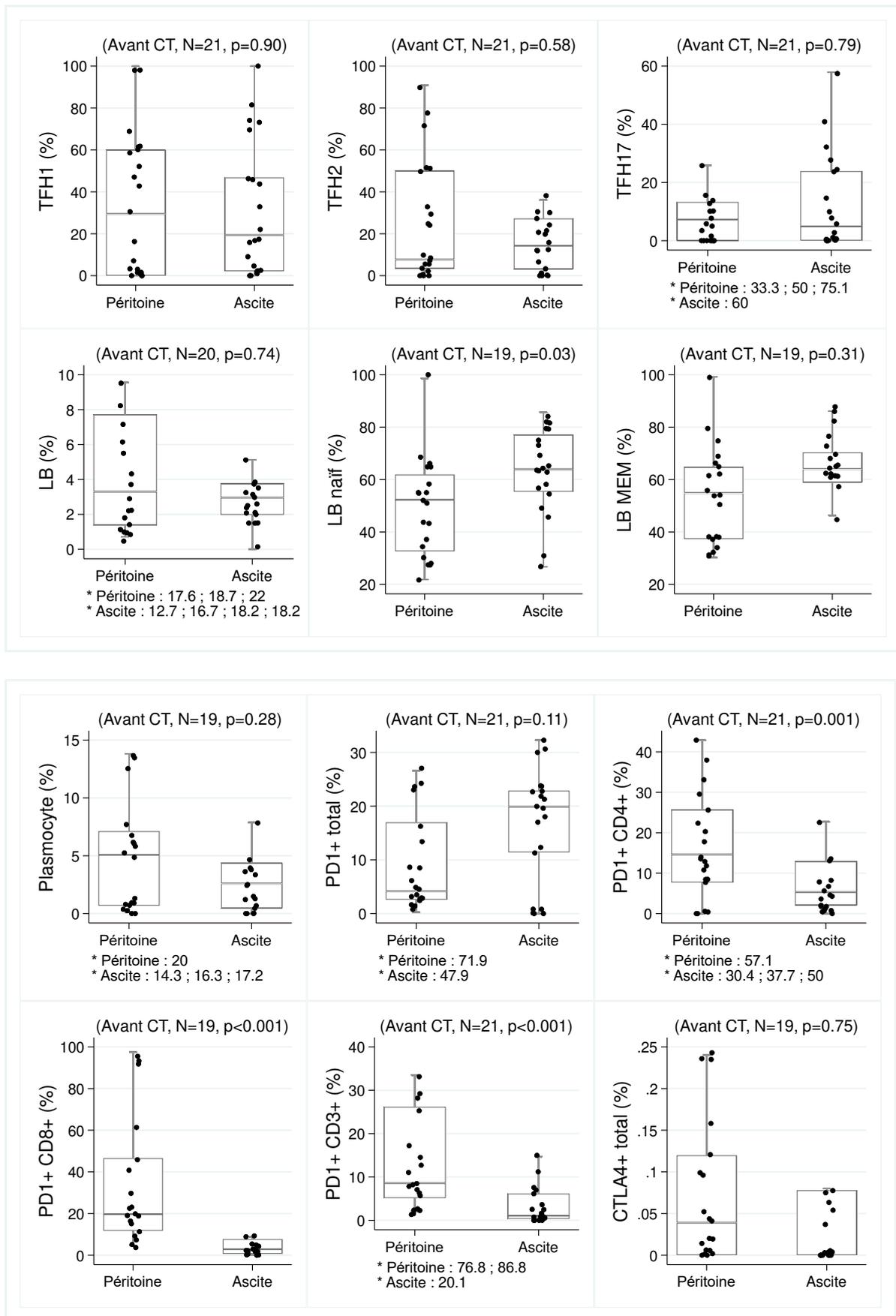


Figure 14. Représentation graphique des populations lymphocytaires dans le péritoine et dans l'ascite (suite 1)

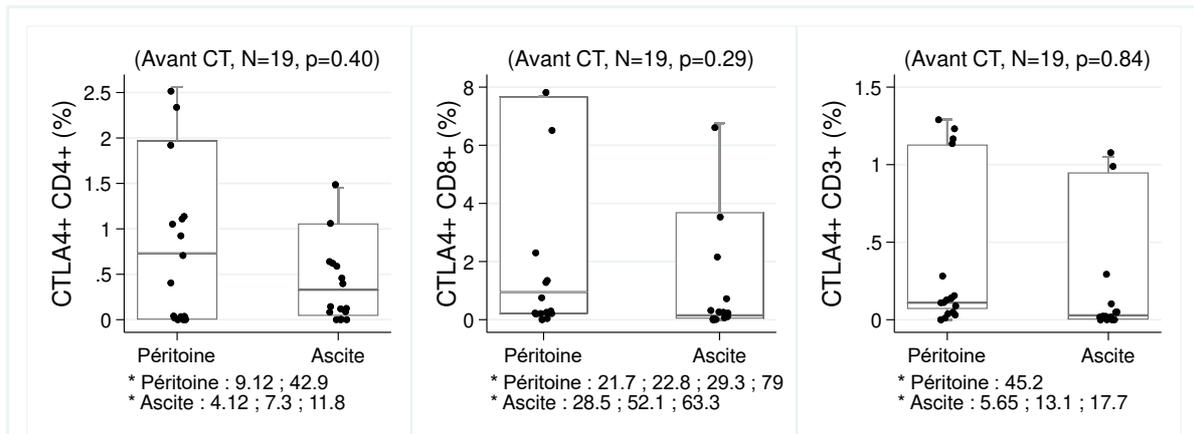


Figure 15. Représentation graphique des populations lymphocytaires dans le péritoine et dans l'ascite (suite 2)

Discussion

1 Principaux résultats

Ce projet exploratoire ancillaire de l'étude TILSOV-1805 visait à comparer les TILs et les TALs afin de déterminer si le micro-environnement tumoral du péritoine pouvait être étudié par l'observation du liquide d'ascite. Pour cela, nous avons utilisé des prélèvements de péritoine et de liquide d'ascite de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avancé. Nous avons identifié différentes sous-populations lymphocytaires à l'aide de la cytométrie en flux puis nous avons utilisé le test de Wilcoxon pour comparer les échantillons d'ascite et de péritoine.

Nous avons ainsi mis en évidence des différences entre TILs et TALs dans certaines sous-populations. Nous avons trouvé une différence de proportion de CD4 avec plus de CD4+ dans l'ascite en comparaison au péritoine. Parmi les différentes populations de LT CD4+ nous avons trouvé, de manière significative, une proportion plus faible CD4+ mémoires et une plus grande proportion de CD4+ régulateurs dans l'ascite en comparaison au péritoine. Parmi les LT CD8+, la proportion de CD8+ mémoires était plus faible dans l'ascite en comparaison au péritoine. Le ratio CD4+/CD8+ était significativement plus important dans l'ascite en comparaison au péritoine, tout en restant inférieur à 1, montrant ainsi une proportion de CD8+ supérieure au CD4+ que ce soit dans l'ascite ou dans le péritoine. Le marquage PD1 des lymphocytes était moins important dans l'ascite en comparaison au péritoine parmi les CD8+ et les CD4+. Les proportions de LT auxiliaires et de LT folliculaires auxiliaires ne semblaient pas différentes. Nous avons mis en évidence une proportion de cellules NK dans l'ascite significativement plus faible en comparaison au péritoine. Le nombre de LB naïfs était augmenté dans l'ascite en comparaison au péritoine.

2 Discussion des résultats

À notre connaissance, il n'y a qu'une seule autre étude ayant comparé les TALs et les TILs dans les cancers de l'ovaire avancés de type épithélial par la technique de cytométrie en flux [89]. Cependant, comme discuté en Introduction, l'étude de Bamias *et al.* incluait une grande partie de patientes ayant reçu de la CTNA, ce qui, comme

discuté précédemment, modifie le MET. Par ailleurs, les patientes chez qui il y avait un prélèvement d'ascite n'avaient pas forcément de prélèvement de carcinose. Ces données n'étaient pas appariées. Plusieurs autres études ont décrit les TALs dans le cancer de l'ovaire. Dans notre étude, la proportion des LT dans l'ascite était de 58 %. Les valeurs retrouvées dans la littérature sont très variables, les études de cytométrie en flux portant souvent sur un nombre d'échantillons faible. Toutefois, ces données restent souvent proches de nos résultats [86, 87, 93, 95]. Dans notre étude, le ratio CD4/CD8 était inférieur à 1, montrant ainsi une proportion supérieure de CD8+ que de CD4+ dans l'ascite. Cette donnée est discordante avec certaines études de la littérature [87, 88, 93] et concordante avec une autre [88]. La variabilité est importante entre différentes études et parmi les patientes d'une même étude [86, 95] mettant en lumière la singularité de chaque patiente. À noter que ces études ont utilisé la technique de cytométrie en flux sur des échantillons de patientes non prétraitées, ayant un MET non modifié par la chimiothérapie.

Cependant, l'ascite a été décrite comme un milieu immunosuppresseur, protumoral. Tran *et al.* [97] ont étudié le rôle de l'ascite maligne de 5 patientes sur la fonctionnalité des TALs. Ils ont observé une inhibition de la dégranulation des lymphocytes T CD8+ et une baisse de la sécrétion d'IL-2 dans le liquide d'ascite, responsable d'une baisse de l'activité antitumorale dans l'ascite. L'étude de Giuntoli *et al.* [87] portait elle sur 37 patientes, afin d'analyser à la fois les LT CD8+ et LT CD4+ dans l'ascite et le profil cytokinique dans l'ascite et dans le péritoine. Les profils cytokiniques retrouvaient une augmentation de la concentration d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-10 dans l'ascite. Ces cytokines sont associées à la progression tumorale par l'inhibition de la polarisation Th1, la promotion en Th2, la migration des cellules tumorales et l'immunosuppression. Ils retrouvaient eux aussi une baisse de l'IL-2 impliquée dans l'expansion des lymphocytes effecteurs et donc dans la réponse antitumorale.

Nous avons retrouvé une baisse des CD8+ mémoires dans l'ascite en comparaison au péritoine. L'étude de Landskron *et al.* [90] ne différenciait pas les TALs mémoires et effecteurs. Ils retrouvaient une augmentation de la population effectrice/mémoire que ce soit pour les LT CD8+ ou les LT CD4+. L'étude de Tran *et al.* [97] suggérait, elle, que les LT CD8+ présents dans l'ascite étaient des effecteurs différenciés. Ils n'ont pas étudié la population de LT CD8+ mémoires. Ces 2 études peuvent être mises en parallèle de l'étude de Zhang *et al.* [46], décrite en introduction, suggérant que les

LT CD8+ suivent les clones tumoraux péritonéaux. Ainsi le liquide d'ascite semble être un milieu de transport actif et pourrait permettre aux LT effecteurs de pister les clones tumoraux afin de délivrer une réponse antitumorale.

La valeur pronostique des LT CD8+ a été étudiée dans le liquide d'ascite de 30 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avancé non prétraitées [92]. Cette étude a montré que les patientes avec un liquide d'ascite riche en LT CD8+ effecteurs/mémoires avaient un meilleur pronostic que celles avec un liquide d'ascite pauvre en LT CD8+ effecteurs/mémoires. Une autre étude de Wefers *et al.* portant sur 62 patientes non prétraitées présentant de l'ascite au diagnostic n'a pas montré d'amélioration significative, mais une tendance à l'amélioration de la SG et de la SSR chez les patientes ayant une ascite riche en CD8+, faible en CD4+ et ayant un ratio CD4/CD8 faible [93].

Nous avons trouvé une différence dans la proportion de CD4+ régulateurs avec une proportion de 7,9 %, plus importante dans l'ascite que dans le péritoine. Cette proportion est proche de celles retrouvées dans la littérature [86, 88, 93, 95]. Dans notre étude, l'ascite semble être un milieu immunosuppresseur avec une augmentation des LT CD4+ régulateurs en comparaison au péritoine.

Nous avons aussi recherché l'épuisement lymphocytaire dans le liquide d'ascite par le marquage de PD1 et CTLA4. Nous avons trouvé une baisse des LT PD1+ dans l'ascite en comparaison au péritoine avec 1 % des CD3+PD1+. Ceci est discordant avec la littérature. L'étude de Wefers *et al.* [93] retrouvait un marquage des LT de 30 % et l'étude de Tonetti *et al.* [95] un marquage proche de 25 %. Le marquage des LT par CTLA4 était insignifiant dans notre étude. Ceci concorde avec l'étude de Wefers *et al.*

3 Discussion de la méthode

La cytométrie en flux est une technique quantitative rapide pouvant détecter de nombreux fluorochromes. Cependant, elle n'est pas dénuée de biais. Il existe une incertitude de mesure quant au fenêtrage permettant d'identifier les différentes sous-populations lymphocytaires. Le biais d'évaluation entre les prélèvements d'ascite et de péritoine est cependant limité car le fenêtrage des sous-types lymphocytaires est le même entre toutes les patientes pour un même type de prélèvement. Le traitement

des échantillons et les analyses ont été faits par une seule et même personne pour tous les prélèvements sans deuxième lecture, ce qui limite la validité interne de l'étude.

Une autre limite de cette technique est la quantité limitée d'anticorps utilisable qui reste toutefois plus importante que les possibilités qu'offre l'IHC. L'anticorps CD45RA permet de différencier les LT naïfs des LT mémoires (mémoire/effecteur et mémoires centraux). L'anticorps CCR7 permet de différencier les LT mémoires effecteurs et mémoires centraux, mais nous ne l'avons pas dans le panel d'anticorps utilisés. Cette technique ne permet pas non plus d'étudier la spécificité de différenciation des LT par l'étude des TCR, ce qui permet par extension d'identifier les clones tumoraux cibles des LT effecteurs [46].

Concernant l'identification des sous-types de LB, les LB naïfs et mémoires n'ont pas été identifiés par le même fenêtrage et il y a sans doute eu un recoupement entre ces deux populations expliquant certains de nos résultats.

Lorsque les patientes ne présentaient pas d'ascite au diagnostic, un lavage péritonéal était réalisé au bloc opératoire afin de récupérer les cellules desquamantes. Cela représentait 24 % des patientes. La composition du lavage péritonéal est probablement différente de celle de l'ascite. En effet, comme vu en introduction, la formation d'ascite est un processus actif et dynamique et contient aussi des composants acellulaires qui influencent la composition cellulaire de l'ascite [80].

D'autre part, l'effectif de patientes incluses dans cette étude est faible (N=21). Ceci est expliqué en grande partie par la pandémie de COVID19 qui s'est développée quelques mois après l'ouverture de l'étude TILSOV-1805 et responsable d'un retard diagnostic chez beaucoup de patientes [98]. Comme nous l'avons vu plus haut, les études précédentes ont aussi porté sur de faibles effectifs et relevaient une grande variabilité inter-patiente.

Enfin, au vu de la multiplicité des tests statistiques et du risque élevé de faux positifs, ces résultats doivent être considérés comme exploratoires.

4 Perspectives

Nous avons vu qu'il existait des différences dans la proportion des sous-types lymphocytaires dans l'ascite et le péritoine. Cependant, nous n'avons pas étudié leur spécificité. L'analyse des TCR des sous-types lymphocytaires reflète les antigènes tumoraux les plus immunogènes. L'analyse des TCR des TALs en parallèle de celle de l'ensemble des TILs d'une même patiente permettrait de savoir si un unique prélèvement d'ascite pourrait refléter l'ensemble des LT différenciés de l'ensemble des implants péritonéaux d'une même patiente. D'autre part, la mise en parallèle de l'analyse des TCR et de la prédiction des néoantigènes par le séquençage du génome des clones tumoraux permettrait d'analyser si les spécificités des TALs permettent d'identifier les antigènes tumoraux les plus immunogènes dans le cancer de l'ovaire.

Dans le cadre de l'étude TILSOV-1805, les caractéristiques cliniques des patientes sont recueillies. L'analyse des caractéristiques phénotypiques des lymphocytes se fait sur des prélèvements de sang, d'ascite et de péritoine avant et après chimiothérapie. Ainsi, cette étude permettra de préciser le lien entre les différents sous-types lymphocytaires dans la réponse à la chimiothérapie et le pronostic. Les inclusions de l'étude TILSOV se poursuivent.

Enfin, sur le plan thérapeutique, l'étude des TILs et des TALs donne une idée des antigènes tumoraux les plus immunogènes. Ainsi l'étude des TILs et des TALs sous chimiothérapie pourrait donner une idée de l'émergence de sous clones tumoraux pouvant être ciblés par des thérapies cellulaires.

Conclusion

Dans un premier temps, ce travail a permis de synthétiser les dernières études sur les TILs dans les cancers de l'ovaire. Ainsi, notre revue de la littérature met en lumière l'hétérogénéité des prélèvements étudiés, l'hétérogénéité des techniques, l'hétérogénéité de leurs normes, la variabilité inter et intra-patientes du MET. Nous retrouvons très peu d'études comparant les TALs au TILs. Cette synthèse renforce l'idée d'homogénéiser la lecture des TILs et des TALs à l'avenir.

Dans un second temps, le projet exploratoire mené à partir de l'étude TILSOV-1805 suggère des différences entre les TILs et les TALs. En particulier en ce qui concerne les cellules T protumorales et les cellules mémoires. Ainsi, dans notre expérience, l'étude des TALs provenant de l'ascite n'est pas superposable à celle des TILs de la carcinose péritonéale dans les cancers de l'ovaire de stade avancé.

Liste des tables

Table 1. Résumé des articles s'intéressant aux TALs chez les patientes suivies pour un cancer de l'ovaire.....	33
Table 2. Anticorps de marquage des lymphocytes	38
Table 3. Caractéristiques histologiques et moléculaires des patientes incluses	46
Table 4. Caractéristiques cliniques des patientes incluses.....	47
Table 5. Proportion des différentes populations lymphocytaires au diagnostic.....	49

Liste des figures

Figure 1. Sous-types histologiques des cancers épithéliaux de l’ovaire et caractéristiques moléculaires des COSHG d’après Lheureux et al. [6]	8
Figure 2. Algorithme décisionnel sur la maintenance après une première ligne de chimiothérapie d’après les recommandations de St Paul de Vence 2021.	14
Figure 3. Expression de molécules activatrices et inhibitrices au cours de l’activation du lymphocyte T tiré du livre « Immunologie fondamentale et immunopathologie » [35].	17
Figure 4. Polarisation des LT tiré du livre « Immunologie fondamentale et immunopathologie » [35]	18
Figure 5. Thérapie cellulaire par transfert adoptif des TILs (A) ou par modification génétique des lymphocytes T sanguins pour qu’ils expriment un TCR ou un CAR spécifique d’un antigène tumoral (B) d’après l’Immuno-Oncology Handbook [58].	27
Figure 6. Mécanisme de formation de l’ascite maligne d’après Ford et al. [76]	28
Figure 7. Composition de l’ascite maligne dans le cancer de l’ovaire d’après Ford et al. [76].....	29
Figure 8. Principe de la cytométrie en flux (tiré de : https://www.univ-reims.fr/minisite_87/plateau-technique-de-cytometrie-en-flux/urcacyt-plateau-technique-de-cytometrie-en-flux,17140,31442.html). SSC : Side Scatter, analyse de la réfraction de la lumière permettant d’étudier la granularité des cellules ; FSC : Forward Scatter, diffusion de la lumière dans l’axe permettant d’étudier la taille des cellules.....	39
Figure 9. Stratégie d’analyse des lymphocytes T	41
Figure 10. Stratégie d’analyse des lymphocytes B	42
Figure 11. Stratégie d’analyse des points de contrôle immunitaires.....	43
Figure 12. Diagramme de flux de l’étude TILSOV-1805.....	46
Figure 13. Représentation graphique des populations lymphocytaires dans le péritoine et dans l’ascite	51
Figure 14. Représentation graphique des populations lymphocytaires dans le péritoine et dans l’ascite (suite 1)	52
Figure 15. Représentation graphique des populations lymphocytaires dans le péritoine et dans l’ascite (suite 2)	53

Références

- [1] Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory n.d. <https://gco.iarc.fr/> (accessed March 21, 2022).
- [2] Survie récente à 1, 3 et 5 ans des patients diagnostiqués entre 2005 et 2010 pour toutes les localisations n.d. <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/epidemiologie/survie/Survie-a-1-3-et-5-ans-des-personnes-diagnostiquees-entre-2005-et-2010#ind31255> (accessed March 21, 2022).
- [3] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021;71:7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>.
- [4] Jessmon P, Boulanger T, Zhou W, Patwardhan P. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2017;17:427–37. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1299575>.
- [5] Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, editors. *Female genital tumours*. 5th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2020.
- [6] Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *Lancet Lond Engl* 2019;393:1240–53. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32552-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32552-2).
- [7] Vergote I, González-Martín A, Ray-Coquard I, Harter P, Colombo N, Pujol P, et al. European experts consensus: BRCA/homologous recombination deficiency testing in first-line ovarian cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2022;33:276–87. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.11.013>.
- [8] Moretta J, Berthet P, Bonadona V, Caron O, Cohen-Haguenaer O, Colas C, et al. [The French Genetic and Cancer Consortium guidelines for multigene panel analysis in hereditary breast and ovarian cancer predisposition]. *Bull Cancer (Paris)* 2018;105:907–17. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.08.003>.
- [9] Patch A-M, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 2015;521:489–94. <https://doi.org/10.1038/nature14410>.
- [10] The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474:609–15. <https://doi.org/10.1038/nature10166>.
- [11] Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Alexandrov LB, Nik-Zainal S, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415–21. <https://doi.org/10.1038/nature12477>.
- [12] PCAWG Mutational Signatures Working Group, PCAWG Consortium, Alexandrov LB, Kim J, Haradhvala NJ, Huang MN, et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature* 2020;578:94–101. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1943-3>.
- [13] Konecny GE, Wang C, Hamidi H, Winterhoff B, Kalli KR, Dering J, et al. Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade

- serous ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:dju249. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju249>.
- [14] Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2003;21:3194–200. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.153>.
- [15] Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011;365:2473–83. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104390>.
- [16] Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011;365:2484–96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103799>.
- [17] Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2002;20:1248–59. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.5.1248>.
- [18] du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009;115:1234–44. <https://doi.org/10.1002/cncr.24149>.
- [19] Sugarbaker PH. Successful management of microscopic residual disease in large bowel cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43 Suppl:S15-25. <https://doi.org/10.1007/s002800051093>.
- [20] Vergote I, Coens C, Nankivell M, Kristensen GB, Parmar MKB, Ehlen T, et al. Neoadjuvant chemotherapy versus debulking surgery in advanced tubo-ovarian cancers: pooled analysis of individual patient data from the EORTC 55971 and CHORUS trials. *Lancet Oncol* 2018;19:1680–7. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30566-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30566-7).
- [21] Kraus F, El Hajj H, Le Deley M-C, Aissaoui O, Gachon B, Chevalier A, et al. A New Paradigm in Managing Advanced Ovarian Cancer: Differentiating Patients Requiring Neoadjuvant Treatment from Primary Cytoreduction. *Cancers* 2021;13:4925. <https://doi.org/10.3390/cancers13194925>.
- [22] Classe J-M, Joly F, Lécuru F, Morice P, Pomel C, Selle F, et al. Prise en charge chirurgicale du cancer épithélial de l'ovaire - première ligne et première rechute: Surgical management of epithelial ovarian cancer - first line and first relapse. *Bull Cancer (Paris)* 2021;108:S13–21. [https://doi.org/10.1016/S0007-4551\(21\)00583-X](https://doi.org/10.1016/S0007-4551(21)00583-X).
- [23] van Driel WJ, Koole SN, Sonke GS. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018;378:1363–4. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1802033>.

- [24] El Hajj H, Vanseymortier M, Hudry D, Bogart E, Abdeddaim C, Leblanc E, et al. Rationale and study design of the CHIPPI-1808 trial: a phase III randomized clinical trial evaluating hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for stage III ovarian cancer patients treated with primary or interval cytoreductive surgery. *ESMO Open* 2021;6:100098. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100098>.
- [25] Koole S, van Stein R, Sikorska K, Barton D, Perrin L, Brennan D, et al. Primary cytoreductive surgery with or without hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for FIGO stage III epithelial ovarian cancer: OVHIPEC-2, a phase III randomized clinical trial. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc* 2020;30:888–92. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-001231>.
- [26] Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim B-G, Oaknin A, Friedlander M, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018;379:2495–505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810858>.
- [27] Banerjee S, Moore KN, Colombo N, Scambia G, Kim B-G, Oaknin A, et al. Maintenance olaparib for patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer and a BRCA mutation (SOLO1/GOG 3004): 5-year follow-up of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021;22:1721–31. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00531-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00531-3).
- [28] Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019;381:2416–28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911361>.
- [29] González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, DePont Christensen R, Graybill W, Mirza MR, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019;381:2391–402. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910962>.
- [30] Coleman RL, Fleming GF, Brady MF, Swisher EM, Steffensen KD, Friedlander M, et al. Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019;381:2403–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1909707>.
- [31] Sénéchal C, Akladios C, Bendifallah S, Ouldamer L, Lecuru F, Rousset-Jablonski C. [Follow-up of patients treated for an epithelial ovarian cancer, place of hormone replacement therapy and of contraception: Article drafted from the French Guidelines in oncology entitled “Initial management of patients with epithelial ovarian cancer” developed by FRANCOGYN, CNGOF, SFOG, GINECO-ARCAGY under the aegis of CNGOF and endorsed by INCa]. *Gynecol Obstet Fertil Senol* 2019;47:250–62. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2018.12.006>.
- [32] Liu YL, Filippova OT, Zhou Q, Iasonos A, Chi DS, Zivanovic O, et al. Characteristics and survival of ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy but not undergoing interval debulking surgery. *J Gynecol Oncol* 2020;31:e17. <https://doi.org/10.3802/jgo.2020.31.e17>.
- [33] Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006;90:1–50. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90001-7).

- [34] Schmidt J, Smith AR, Magnin M, Racle J, Devlin JR, Bobisse S, et al. Prediction of neo-epitope immunogenicity reveals TCR recognition determinants and provides insight into immunoediting. *Cell Rep Med* 2021;2:100194. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100194>.
- [35] Association des collèges des enseignants d'immunologie des universités de langue française, editor. *Immunologie fondamentale et immunopathologie: enseignements thématique et intégré tissu lymphoïde et sanguin, immunopathologie et immuno-intervention*. 2e éd. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2018.
- [36] Basu A, Ramamoorthi G, Albert G, Gallen C, Beyer A, Snyder C, et al. Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2021;12:669474. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669474>.
- [37] Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol* 2014;5:276. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00276>.
- [38] Fialová A, Partlová S, Sojka L, Hromádková H, Brtnický T, Fučíková J, et al. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *Int J Cancer* 2013;132:1070–9. <https://doi.org/10.1002/ijc.27759>.
- [39] Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 2019;50:1132–48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>.
- [40] Hwang W-T, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2012;124:192–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.09.039>.
- [41] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020177>.
- [42] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9. <https://doi.org/10.1038/nm1093>.
- [43] Leffers N, Gooden MJM, de Jong RA, Hoogeboom B-N, ten Hoor KA, Hollema H, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother CII* 2009;58:449–59. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0583-5>.
- [44] Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:18538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509182102>.
- [45] Foord E, Arruda LCM, Gaballa A, Klynning C, Uhlin M. Characterization of ascites- and tumor-infiltrating gammadelta T cells reveals distinct repertoires and a beneficial role in ovarian cancer. *Sci Transl Med* 2021;13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb0192>.

- [46] Zhang AW, McPherson A, Milne K, Kroeger DR, Hamilton PT, Miranda A, et al. Interfaces of Malignant and Immunologic Clonal Dynamics in Ovarian Cancer. *Cell* 2018;173:1755-1769.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.073>.
- [47] Bailey C, Black JRM, Reading JL, Litchfield K, Turajlic S, McGranahan N, et al. Tracking Cancer Evolution through the Disease Course. *Cancer Discov* 2021;11:916–32. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1559>.
- [48] Jiménez-Sánchez A, Cybulska P, Mager KL, Koplev S, Cast O, Couturier D-L, et al. Unraveling tumor-immune heterogeneity in advanced ovarian cancer uncovers immunogenic effect of chemotherapy. *Nat Genet* 2020;52:582–93. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0630-5>.
- [49] Leary A, Genestie C, Blanc-Durand F, Gouy S, Dunant A, Maulard A, et al. Neoadjuvant chemotherapy alters the balance of effector to suppressor immune cells in advanced ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother Cll* 2021;70:519–31. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02670-0>.
- [50] Pölcher M, Braun M, Friedrichs N, Rudlowski C, Bercht E, Fimmers R, et al. Foxp3(+) cell infiltration and granzyme B(+)/Foxp3(+) cell ratio are associated with outcome in neoadjuvant chemotherapy-treated ovarian carcinoma. *Cancer Immunol Immunother Cll* 2010;59:909–19. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0817-1>.
- [51] Böhm S, Montfort A, Pearce OMT, Topping J, Chakravarty P, Everitt GLA, et al. Neoadjuvant Chemotherapy Modulates the Immune Microenvironment in Metastases of Tubo-Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2016;22:3025–36. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2657>.
- [52] Mesnage SJL, Auguste A, Genestie C, Dunant A, Pain E, Drusch F, et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017;28:651–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw625>.
- [53] Strickland KC, Howitt BE, Shukla SA, Rodig S, Ritterhouse LL, Liu JF, et al. Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer. *Oncotarget* 2016;7:13587–98. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7277>.
- [54] Matsushita H, Hasegawa K, Oda K, Yamamoto S, Asada K, Karasaki T, et al. Neoantigen load and HLA-class I expression identify a subgroup of tumors with a T-cell-inflamed phenotype and favorable prognosis in homologous recombination-proficient high-grade serous ovarian carcinoma. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000375. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000375>.
- [55] Wei Y, Ou T, Lu Y, Wu G, Long Y, Pan X, et al. Classification of ovarian cancer associated with BRCA1 mutations, immune checkpoints, and tumor microenvironment based on immunogenomic profiling. *PeerJ* 2020;8:e10414. <https://doi.org/10.7717/peerj.10414>.
- [56] Xiao X, Dong D, He W, Song L, Wang Q, Yue J, et al. Mismatch repair deficiency is associated with MSI phenotype, increased tumor-infiltrating lymphocytes and

- PD-L1 expression in immune cells in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2018;149:146–54. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.02.009>.
- [57] Tumeah PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515:568–71. <https://doi.org/10.1038/nature13954>.
- [58] Jalving M de Vries, EGE, Haanen JBAG, Califano R Lugowska, Iwona, Garassino, Marina Chiara. *Immune Checkpoint Blockade: Response Patterns and Assessment of Response* 2018.
- [59] Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 2017;9:34. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0424-2>.
- [60] Moore KN, Bookman M, Sehouli J, Miller A, Anderson C, Scambia G, et al. Atezolizumab, Bevacizumab, and Chemotherapy for Newly Diagnosed Stage III or IV Ovarian Cancer: Placebo-Controlled Randomized Phase III Trial (IMagyn050/GOG 3015/ENGOT-OV39). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2021;39:1842–55. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.00306>.
- [61] Monk BJ, Colombo N, Oza AM, Fujiwara K, Birrer MJ, Randall L, et al. Chemotherapy with or without avelumab followed by avelumab maintenance versus chemotherapy alone in patients with previously untreated epithelial ovarian cancer (JAVELIN Ovarian 100): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021;22:1275–89. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00342-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00342-9).
- [62] Zhu J, Yan L, Wang Q. Efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors in ovarian cancer: a single-arm meta-analysis. *J Ovarian Res* 2021;14:112. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00862-5>.
- [63] Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017;23:703–13. <https://doi.org/10.1038/nm.4333>.
- [64] McGrail DJ, Pilié PG, Rashid NU, Voorwerk L, Slagter M, Kok M, et al. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2021;32:661–72. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.02.006>.
- [65] Bobisse S, Genolet R, Roberti A, Tanyi JL, Racle J, Stevenson BJ, et al. Sensitive and frequent identification of high avidity neo-epitope specific CD8 + T cells in immunotherapy-naive ovarian cancer. *Nat Commun* 2018;9:1092. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03301-0>.
- [66] Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, et al. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015;33:4015–22. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.3397>.
- [67] Disis ML, Taylor MH, Kelly K, Beck JT, Gordon M, Moore KM, et al. Efficacy and Safety of Avelumab for Patients With Recurrent or Refractory Ovarian Cancer: Phase 1b Results From the JAVELIN Solid Tumor Trial. *JAMA Oncol* 2019;5:393–401. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.6258>.

- [68] Matulonis UA, Shapira-Frommer R, Santin AD, Lisyanskaya AS, Pignata S, Vergote I, et al. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2019;30:1080–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz135>.
- [69] Zamarin D, Burger RA, Sill MW, Powell DJ, Lankes HA, Feldman MD, et al. Randomized Phase II Trial of Nivolumab Versus Nivolumab and Ipilimumab for Recurrent or Persistent Ovarian Cancer: An NRG Oncology Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2020;38:1814–23. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02059>.
- [70] Chardin L, Leary A. Immunotherapy in Ovarian Cancer: Thinking Beyond PD-1/PD-L1. *Front Oncol* 2021;11:795547. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.795547>.
- [71] Johnson RL, Cummings M, Thangavelu A, Theophilou G, de Jong D, Orsi NM. Barriers to Immunotherapy in Ovarian Cancer: Metabolic, Genomic, and Immune Perturbations in the Tumour Microenvironment. *Cancers* 2021;13:6231. <https://doi.org/10.3390/cancers13246231>.
- [72] Kandalaf LE, Odunsi K, Coukos G. Immune Therapy Opportunities in Ovarian Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet* 2020;40:1–13. https://doi.org/10.1200/EDBK_280539.
- [73] Kandalaf LE, Odunsi K, Coukos G. Immunotherapy in Ovarian Cancer: Are We There Yet? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2019;37:2460–71. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00508>.
- [74] Dafni U, Michielin O, Lluesma SM, Tsourtis Z, Polydoropoulou V, Karlis D, et al. Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2019;30:1902–13. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz398>.
- [75] Sarivalasis A, Morotti M, Mulvey A, Imbimbo M, Coukos G. Cell therapies in ovarian cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2021;13:17588359211008400. <https://doi.org/10.1177/17588359211008399>.
- [76] Ford CE, Werner B, Hacker NF, Warton K. The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *Br J Cancer* 2020;123:9–16. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0875-x>.
- [77] Rickard BP, Conrad C, Sorrin AJ, Ruhi MK, Reader JC, Huang SA, et al. Malignant Ascites in Ovarian Cancer: Cellular, Acellular, and Biophysical Determinants of Molecular Characteristics and Therapy Response. *Cancers* 2021;13:4318. <https://doi.org/10.3390/cancers13174318>.
- [78] Kipps E, Tan DSP, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer* 2013;13:273–82. <https://doi.org/10.1038/nrc3432>.
- [79] Ahmed N, Stenvers KL. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol* 2013;3:256. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00256>.

- [80] Tan DSP, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:925–34. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70939-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70939-1).
- [81] Kim S, Kim B, Song YS. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci* 2016;107:1173–8. <https://doi.org/10.1111/cas.12987>.
- [82] Ayantunde AA, Parsons SL. Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2007;18:945–9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl499>.
- [83] Gotlieb WH, Amant F, Advani S, Goswami C, Hirte H, Provencher D, et al. Intravenous aflibercept for treatment of recurrent symptomatic malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Oncol* 2012;13:154–62. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70338-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70338-2).
- [84] Huang H, Li YJ, Lan CY, Huang QD, Feng YL, Huang YW, et al. Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *Neoplasma* 2013;60:546–52. https://doi.org/10.4149/neo_2013_071.
- [85] Kim S, Kim S, Kim J, Kim B, Kim SI, Kim MA, et al. Evaluating Tumor Evolution via Genomic Profiling of Individual Tumor Spheroids in a Malignant Ascites. *Sci Rep* 2018;8:12724. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31097-y>.
- [86] Feigenberg T, Clarke B, Virtanen C, Plotkin A, Letarte M, Rosen B, et al. Molecular profiling and clinical outcome of high-grade serous ovarian cancer presenting with low- versus high-volume ascites. *BioMed Res Int* 2014;2014:367103. <https://doi.org/10.1155/2014/367103>.
- [87] Giuntoli RL, Webb TJ, Zoso A, Rogers O, Diaz-Montes TP, Bristow RE, et al. Ovarian Cancer-associated Ascites Demonstrates Altered Immune Environment: Implications for Antitumor Immunity. *ANTICANCER Res* 2009;10.
- [88] Jang M, Yew P-Y, Hasegawa K, Ikeda Y, Fujiwara K, Fleming GF, et al. Characterization of T cell repertoire of blood, tumor, and ascites in ovarian cancer patients using next generation sequencing. *Oncol Immunology* 2015;4:e1030561. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1030561>.
- [89] Bamias A, Tsiatas ML, Kafantari E, Liakou C, Rodolakis A, Voulgaris Z, et al. Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. *Gynecol Oncol* 2007;106:75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.02.029>.
- [90] Landskron J, Helland Ø, Torgersen KM, Aandahl EM, Gjertsen BT, Bjørge L, et al. Activated regulatory and memory T-cells accumulate in malignant ascites from ovarian carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother Cll* 2015;64:337–47. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1636-6>.
- [91] Lukesova S, Vroblova V, Tosner J, Kopecky J, Sedlakova I, Čermáková E, et al. Comparative study of various subpopulations of cytotoxic cells in blood and ascites from patients with ovarian carcinoma. *Współczesna Onkol* 2015;4:290–9. <https://doi.org/10.5114/wo.2015.54388>.

- [92] Lieber S, Reinartz S, Raifer H, Finkernagel F, Dreyer T, Bronger H, et al. Prognosis of ovarian cancer is associated with effector memory CD8+ T cell accumulation in ascites, CXCL9 levels and activation-triggered signal transduction in T cells. *Oncoimmunology* 2018;7:e1424672. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1424672>.
- [93] Wefers C, Duiveman-de Boer T, Yigit R, Zusterzeel PLM, van Altena AM, Massuger LFAG, et al. Survival of Ovarian Cancer Patients Is Independent of the Presence of DC and T Cell Subsets in Ascites. *Front Immunol* 2018;9:3156. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03156>.
- [94] Vazquez J, Chavarria M, Lopez GE, Felder MA, Kapur A, Romo Chavez A, et al. Identification of unique clusters of T, dendritic, and innate lymphoid cells in the peritoneal fluid of ovarian cancer patients. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2020;84:e13284. <https://doi.org/10.1111/aji.13284>.
- [95] Tonetti CR, de Souza-Araujo CN, Yoshida A, da Silva RF, Alves PCM, Mazzola TN, et al. Ovarian Cancer-Associated Ascites Have High Proportions of Cytokine-Responsive CD56bright NK Cells. *Cells* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/cells10071702>.
- [96] Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev* 2015;4:1. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>.
- [97] Tran E, Nielsen JS, Wick DA, Ng AV, Johnson LDS, Nesslinger NJ, et al. Polyfunctional T-cell responses are disrupted by the ovarian cancer ascites environment and only partially restored by clinically relevant cytokines. *PLoS One* 2010;5:e15625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015625>.
- [98] Goenka L, Anandaradje A, Nakka T, Kayal S, Dubashi B, Chaturvedula L, et al. The “collateral damage” of the war on COVID-19: impact of the pandemic on the care of epithelial ovarian cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 2021;38:137. <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01588-6>.

AUTEUR : Nom : LE GUELLEC **Prénom :** Solenn

Date de Soutenance : 20/05/2022

Titre de la Thèse : Comparaison des caractéristiques phénotypiques de l'infiltrat lymphocytaire dans les cancers de l'ovaire avancés : analyse exploratoire de données issues de l'ascite *versus* carcinose péritonéale.

Thèse - Médecine - Lille 2022

Cadre de classement : Oncologie Médicale

DES + FST ou option : Oncologie Médicale

Mots-clés : cancer de l'ovaire, lymphocytes infiltrant la tumeur, ascite

Résumé :

Contexte : De nombreuses études se sont intéressées à la valeur pronostique des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) dans les cancers de l'ovaire avancés et les recherches actuelles se focalisent sur leur utilisation en thérapeutique. L'étude des TILs au cours de l'évolution de la maladie est freinée par la difficulté à obtenir du matériel tumoral. Les lymphocytes associés aux tumeurs (TALs) présents dans l'ascite sont plus facilement accessibles. Afin de faciliter l'étude du micro-environnement au cours de la maladie, nous avons comparé les TILs et les TALs.

Matériel et Méthodes : Dans cette étude monocentrique, interventionnelle, non randomisée chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ou des trompes avancé, de stade FIGO IIIC ou IV, éligible à une coelioscopie de diagnostic, des échantillons d'ascite et de carcinose péritonéale (CP) ont été collectés. Des analyses de cytométrie en flux ont permis de comparer les TILs et les TALs. L'analyse statistique a été faite par le test de Wilcoxon pour des données appariées. Cette étude est enregistrée sur ClinicalTrials.gov, numéro NCT03922776.

Résultats : Vingt et une patientes ont été incluses dans l'étude TILSOV-1805. Les échantillons d'ascite et de péritoine ont été obtenus avant chimiothérapie. Nous avons trouvé une différence dans la proportion de lymphocytes CD4+ ($p=0.002$) et du ratio CD4+/CD8+ ($p=0.002$) dans l'ascite en comparaison à la CP. Dans les sous-populations de lymphocytes T, nous avons trouvé une différence avec plus de lymphocytes T régulateurs ($p=0.003$) et moins de lymphocytes T mémoires dans l'ascite en comparaison à la CP. La proportion de cellules B naïves était plus importante dans l'ascite en comparaison à la CP ($p=0.03$). Nous n'avons pas observé de différences dans la proportion de lymphocytes auxiliaires ou folliculaires auxiliaires entre les deux types d'échantillons. Nous avons observé une baisse d'expression de PD1 sur les TALs en comparaison aux TILs sans différence concernant l'expression de CTLA4.

Conclusion : Nos résultats suggèrent des différences entre les TILs et les TALs en particulier concernant les cellules T protumorales et les cellules naïves. Ainsi, les TALs provenant de l'ascite ne peuvent être considérés comme un substitut aux TILs de la carcinose péritonéale dans les cancers de l'ovaire.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Nicolas Penel

Assesseurs : Madame le Docteur Stéphanie Bécourt,
Madame le Docteur Camille Pasquesoone

Directeur : Madame le Docteur Delphine Hudry